CARACTERES DIAGNÓSTICOS FOLIARES EN *ISOETES* (PTERIDOPHYTA, ISOETACEAE)[1,2]

Cristina H. Rolleri[3] *and Carmen Prada*[4]

Resumen

Se han estudiado caracteres foliares de 25 taxones europeos, norteafricanos, norteamericanos y sudamericanos, terrestres, anfibios y acuáticos, del género *Isoetes* L. (Pteridophyta, Isoetaceae). Los caracteres morfológicos foliares investigados tienen un valor diagnóstico variable. Son específicos y deberían incluirse en las descripciones taxonómicas las ornamentaciones cuticulares, los tipos de márgenes, los modelos y las relaciones longitud/anchura (relaciones l/a) celulares de las células epidérmicas, los tipos de protuberancias intercelulares pécticas (PIP), los modelos y las relaciones l/a celulares de las células epidérmicas del velo, el modelo epidérmico adaxial de los esporangios y la naturaleza de sus paredes celulares. Son caracteres de grupos de especies los contornos de las secciones foliares, los tipos de colénquima (en haces, lacunar o parcialmente laminar, los dos últimos descritos aquí por primera vez), los tipos de células de los diafragmas, la presencia y tipos de PIP, la extensión de la endodermis en las cámaras aeríferas, la lígula secretora persistente o esclerosada tempranamente. Son genéricos la presencia de lígula secretora y los tipos de endodermis. Al género se le ha atribuido escasez de caracteres morfológicos o variación de éstos con el ambiente, dos conceptos que aquí se discuten ante las nuevas evidencias.

Abstract

Foliar characters were studied in 25 European, North African, North American, and South American terrestrial, amphibious, and aquatic taxa of the genus *Isoetes* L. (Pteridophyta, Isoetaceae). The foliar characters investigated have a variable diagnostic value. The presence and types of cuticular ornamentations, types of margins, epidermal patterns and cell ratios of the epidermis, types of IPP (intercellular pectic protuberances) in the cells of the leaf diaphragms, epidermal patterns and cell ratios of velum, epidermal patterns, and nature of walls in the adaxial epidermis of sporangia may be good diagnostic specific characters that should be included in taxonomic descriptions. Transverse sections of the microphylls, the types and distribution of collenchyma (fascicular, lacunar, or partially laminar collenchyma, with the latter two types described here for the first time), the cell types of leaf diaphragms, the presence of IPP in these cells, the partial or complete endodermis in the air chambers, and the presence of a persistent mucilage-secreting or an early lignified ligule are features that characterize species groups in *Isoetes*. The mucilage-secreting ligula and the types of endodermis can be considered as generic traits in *Isoetes*. The genus was largely considered as lacking good diagnostic characters or having rather environmentally influenced traits, two concepts that are discussed here after presentation of the new evidence.

Key words: foliar diagnostic characters, epidermis, *Isoetes*, microphylls, labium, ligula, sporangial adaxial wall, velum.

Los trabajos sobre morfología interna son escasos en *Isoetes* L. (Pteridophyta, Isoetaceae) y su aplicación a la sistemática del género no es frecuente. Los estudiados con más detalle han sido los relacionados con el cormo, una estructura poco variable en las especies del género. Algunos trabajos trataron caracteres foliares en general, además del cormo y el sistema vascular, siempre en relación con una o unas pocas especies (Scott & Hill, 1900; Stokey, 1909; West & Takeda, 1915).

Pfeiffer (1922) recopiló los datos de las especies conocidas hasta entonces y utilizó, entre otros rasgos anatómicos externos e internos, los estomas y los tejidos mecánicos hipodérmicos, a los que llamó "peripheral bast" y consideró de sostén. Ese trabajo representó un cambio de concepto en la clasificación infragenérica. A partir de él se abandonó la clasificación basada en las características del medio que se había utilizado hasta ese momento (Braun, 1862; Motelay & Vendryès, 1882; Baker, 1880) y se pasó

[1] Este trabajo se realizó con el apoyo del Ministerio de Educación, Cultura y Deportes de España (MECD), organismo que facilitó la participación de la Dra. Cristina H. Rolleri en un proyecto de investigación pteridológica realizado en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense (Madrid), mediante el otorgamiento de una Ayuda para Profesores Extranjeros en Régimen de Año Sabático (Referencia: SAB2002-0005).

[2] Los editores agradecen a Sophia Balcomb su colaboración en la redacción de este manuscrito.

[3] Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática (LEAVES), Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, 64 N° 3 entre 120 y diagonal 113 B1904 DZB La Plata, Argentina. tinar@speedy.com.ar.

[4] Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense, E-28040 Madrid, España. cpm@bio.ucm.es.

a una sistemática basada en rasgos esporales. La mayoría de los caracteres anatómicos nunca fueron evaluados ni utilizados en la sistemática, por considerarlos influidos por el medio.

Hall (1971) revisó las especies ganeanas de *Isoetes* y analizó caracteres nuevos como la presencia de cuñas y verrugas cuticulares, los tipos de células de los diafragmas foliares, las protuberancias intercelulares pécticas (PIP), que designó como "minute acicular spines", el número de canales intrastelares y la epidermis adaxial del esporangio, aunque dudó del valor taxonómico de algunos de ellos. Prada (1979a) retomó muchos de los caracteres foliares propuestos por Hall (1971) y los aplicó a especies ibéricas de *Isoetes*. Kott y Britton (1985) analizaron el color de la epidermis adaxial del esporangio en especies norteamericanas de *Isoetes* y lo consideraron un carácter taxonómico válido porque se correlacionaba con otros caracteres específicos, aunque esos autores no estudiaron el origen del color.

Hickey (1986) y Taylor y Hickey (1992) interpretaron la presencia de algunos caracteres morfológicos y anatómicos de los microfilos, tales como los filopodios, las hojas transformadas en escamas, los cordones colenquimáticos subepidérmicos y la pigmentación esporangial de ciertos grupos de taxones del género como el resultado de la convergencia debida a los cambios de hábitat ocurridos durante la historia evolutiva de *Isoetes* y utilizaron dichos caracteres para proponer una nueva división infragenérica. Troia et al. (1999) estudiaron la anatomía foliar comparada de dos especies, *I. durieui* Bory e *I. histrix* Bory, pero la única diferencia que destacaron fue el mayor tamaño de las células oclusivas de los estomas de la primera. Romeo et al. (2000) estudiaron la estructura de los canales intrastelares y pusieron en evidencia, mediante fluorescencia inducida por colorantes, la endodermis con bandas de Caspary presente en los mismos. Musselman y Roux (2002) ilustraron por primera vez, con microscopía electrónica de barrido, las ornamentaciones cuticulares con forma de verrugas, en *I. toximontana* L. J. Musselman & J. P. Roux.

Prada y Rolleri (2003) estudiaron comparativamente varios caracteres foliares en taxones ibéricos de *Isoetes* y analizaron rasgos como ornamentaciones cuticulares, modelos epidérmicos y estomas, secciones transversales foliares, distribución del colénquima subepidérmico, diafragmas foliares y presencia o ausencia de PIP. Rolleri y Prada (2004) estudiaron la endodermis de los canales intrastelares y describieron la endodermis de las cámaras aeríferas, y Prada y Rolleri (2005) dieron a conocer un estudio comparativo de las PIP y su valor diagnóstico en especies de *Isoetes*, en el que aplicaron por primera vez un conjunto amplio de caracteres morfológicos externos e internos en la diagnosis de *I. anatolica* Prada & Rolleri.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de las especies ibéricas (Prada & Rolleri, 2003) y en la hipótesis de que los caracteres foliares son diagnósticos y el mejor conocimiento de su variación podría ayudar a la elaboración de una sistemática más natural que la basada principalmente en las esporas, se consideró importante extender el análisis de esos caracteres a un grupo más amplio de especies. Se eligieron especies europeas, norteafricanas, sudamericanas y norteamericanas, que crecen en diferentes ambientes y a distintas alturas sobre el nivel del mar. Los taxones estudiados fueron *Isoetes adspersa* A. Braun, *I. anatolica, I. andina* Spruce ex Hook., *I. boliviensis* U. Weber, *I. boryana* Durieu, *I. brochonii* Motelay, *I. durieui*, *I. echinospora* Durieu, *I. engelmannii* A. Braun, *I. histrix*, *I. howellii* Engelm., *I. killipii* C. V. Morton, *I. lacustris* L., *I. lechleri* Mett., *I. longissima* Bory, *I. malinverniana* Ces. & De Not., *I. melanopoda* J. Gay & Durieu, *I. novo-granadensis* H. P. Fuchs, *I. nuttallii* A. Braun ex Engelm., *I. orcuttii* A. A. Eaton, *I. piedmontana* (N. Pfeiffer) C. F. Reed, *I. setacea* Lam., *I. storkii* T. C. Palmer, *I. velata* A. Braun subsp. *velata* e *I. velata* A. Braun subsp. *asturicensis* (Laínz) Rivas Mart. & Prada.

Los caracteres fueron estudiados comparativamente en todas las especies y se aplicaron a tres casos diferentes para mostrar su utilidad: (1) en el caso de tres especies terrestres del oeste de Estados Unidos de América, que se han encontrado conviviendo en la misma localidad y ambiente, *Isoetes howellii*, *I. nuttallii* e *I. orcuttii*, las dos últimas, morfológicamente similares (Taylor et al., 1993); (2) en el grupo formado por *I. brochonii*, *I. echinospora* e *I. lacustris*, todas especies acuáticas, fenotípicamente muy similares, cuya determinación es difícil debido a sus relaciones de parentesco (Taylor & Hickey, 1992) y que a menudo conviven en los mismos lagos, y (3) en el grupo formado por *I. adspersa*, *I. boryana*, *I. longissima*, *I. velata* subsp. *velata* e *I. velata* subsp. *asturicensis*, que incluye especies morfológicamente similares, anfibias a casi terrestres o de aguas corrientes, con los mismos tipos de ornamentaciones esporales y con *status* taxonómico dudoso (Prelli, 2001).

Materiales y Métodos

En este trabajo se utilizó material de herbario restaurado, rehidratado o fresco, de recolecciones propias y de los herbarios COI, JACA, MA, MACB y SEV (Holmgren et al., 1990). Los pliegos que se citan en el Apéndice 1 contienen varios ejemplares, todos

los cuales han sido estudiados. Las colecciones citadas como *Prada s. n.* incluyen como mínimo 20 plantas, todas las cuales han sido estudiadas. Las observaciones se realizaron con microscopios óptico y electrónico de barrido. La restauración del material de herbario es conveniente especialmente para el estudio de las secciones foliares y se llevó a cabo de acuerdo con Prada y Rolleri (2003).

Para estudios de epidermis en superficie los microfilos se diafanizaron con hidróxido de sodio 2% acuoso, se blanquearon con hipoclorito de sodio comercial diluido 1:1, se lavaron repetidamente con agua corriente, se colorearon y se montaron en glicerina. Para los estudios de epidermis en superficie con ejemplares de herbario el material puede diafanizarse sin necesidad de restauración previa. Para estudios de secciones foliares se efectuaron cortes de los microfilos a mano alzada, se colorearon y se observaron montados en glicerina. La preparación de las muestras procedentes de material de herbario, para observar epidermis adaxial del esporangio y del velo, lígula y labio, se llevó a cabo sumergiendo los esporofilos durante 5–10 minutos en hidróxido de sodio 6% acuoso para ablandarlos y desprender los tejidos con más facilidad mediante pinzas de punta fina.

Todas las muestras se observaron con microscopio óptico, coloreadas con TBO 1% acuoso (Gurr, 1966). El TBO es un colorante metacromático, catiónico, transitorio, que colorea los tejidos con carga negativa. Es conveniente un breve lavado con agua acidificada con unas gotas de ácido acético para obtener una diferenciación más rápida. Las paredes primarias de las epidermis en general, las paredes pectinadas (PIP, colénquima) y las células secretoras del margen de la lígula se colorean de rosa a púrpura, mientras que las paredes celulósicas o el almidón no se colorean; además, en el caso de las células secretoras, sus núcleos se tiñen intensamente de color verde por la presencia de ácidos nucleicos y polifosfatos. En presencia de taninos o fenoles, predomina la reacción del colorante con los polifenoles, dando un color verde intenso. En las paredes secundarias lignificadas o suberificadas da color azul, azul-verdoso o azul brillante.

También se utilizó un microscopio de fluorescencia Zeiss con el fin de comprobar la fluorescencia intrínseca. La fluorescencia intrínseca se atribuye principalmente a la presencia de metabolitos secundarios y puede resultar útil en la determinación de ciertas sustancias, como la lignina, que emite autofluorescencia verdosa (Ruzin, 1999: 174). Aquí se utilizó para detectar las endodermis y para determinar si la reacción de color verde de ciertas células de la epidermis de los esporangios era debida a la presencia de polifenoles como precursores de taninos o de lignina.

Las medidas de los estomas y las relaciones longitud/anchura (relaciones l/a) se tomaron en todos los ejemplares estudiados. Los valores de las relaciones l/a celulares representan la media de las medidas tomadas en todas las células presentes en 10 campos elegidos al azar, tanto en epifilos como en hipofilos, observados con 200 aumentos (ca. 0.25 mm^2). Las dimensiones de los estomas representan la media de 25 medidas por cada microfilo, efectuadas en todos los ejemplares revisados. Las ilustraciones de los diversos aspectos de la morfología interna se realizaron con un microscopio Olympus CX 41 provisto de cámara clara.

Para los estudios con microscopio electrónico de barrido los fragmentos de microfilos procedentes de material fresco o restaurado se sometieron a fijación en punto crítico, se montaron sobre los soportes en plata coloidal y durofix, se metalizaron con oro bajo vacío y se fotografiaron con un microscopio JEOL JSM–T330A a 15 kV. En algunas especies las PIP y la endodermis de las cámaras aeríferas se observaron también en material de herbario simplemente rehidratado para ablandar los fragmentos de microfilos y poder abrirlos longitudinalmente para exponer al exterior dichas estructuras.

La terminología referente a la epidermis, PIP, secciones foliares y endodermis se ha utilizado siguiendo los criterios de Prada y Rolleri (2003) y Rolleri y Prada (2004), pero en el caso de las ornamentaciones cuticulares se ha preferido aquí no distinguir entre estrías y pliegues, y calificar como estrías a todas las ornamentaciones positivas, longitudinalmente alargadas, de sección curva o aguda, de espesor y continuidad variables.

Resultados

Los microfilos de las especies estudiadas de *Isoetes* son ensiformes, nacen helicoidalmente sobre el cormo y tienen sección transversal variable. Los microfilos externos son los más maduros, mientras que los más internos son juveniles. La base está ensanchada y presenta una expansión membranosa o ala que se prolonga acrópetamente con mayor o menor extensión. Están recubiertos por una epidermis cutinizada e internamente presentan un mesofilo provisto de cuatro cámaras aeríferas interrumpidas por diafragmas transversales formados por células globosas, lobuladas o estrelladas, diferentes de las del resto del mesofilo. Con frecuencia se presenta tejido mecánico de tipo colenquimático, diversamente distribuido y de posición hipodérmica.

En la base de la cara adaxial de los microfilos se forma la lígula, una pequeña lengüeta foliosa adpresa con el microfilo. Está separada del esporangio por un

labio más o menos desarrollado. El esporangio está inmerso en la fóvea basal del microfilo, cubierto o no por un velo. Los microfilos externos presentan generalmente macrosporangios y los más internos, generalmente microsporangios. La presencia y madurez de los esporangios depende del grado de desarrollo de las plantas y del momento de la estación de crecimiento en que se encuentran.

EPIDERMIS DE LOS MICROFILOS EN SUPERFICIE

Ornamentaciones y cuñas cuticulares. Las células epidérmicas de las especies estudiadas de *Isoetes* están cutinizadas. En vista superficial, tienen contorno poligonal. La pared externa es lisa u ornamentada y las ornamentaciones que se han observado consisten de estrías o verrugas. Las estrías son arrugas paralelas, finas o gruesas, que discurren longitudinalmente pasando o no por encima de las paredes de contacto transversales de las células epidérmicas. Las verrugas son protuberancias discretas, de forma variable, esféricas a elipsoidales, que sobresalen notablemente y se encuentran por lo general sobre estrías cuticulares. Todos los rasgos de la cutícula se observan bien tanto en superficie como en cortes transversales y mediante microscopio óptico o electrónico de barrido. Se colorean y destacan claramente con TBO. Son visibles por igual en microfilos centrales o periféricos del cormo y se forman tempranamente en los microfilos juveniles de las plántulas.

Las cutículas son lisas o casi lisas en *Isoetes anatolica* (Fig. 1C), *I. boliviensis*, *I. echinospora* (Fig. 1B), *I. engelmannii*, *I. howellii*, *I. lechleri*, *I. malinverniana*, *I. melanopoda*, *I. orcuttii* e *I. piedmontana* (Fig. 1A). Estrías irregulares, frecuentemente discontinuas, se han observado en *I. andina* (Fig. 2A), *I. brochonii* (Fig. 1E), *I. killipii* (Fig. 1F), *I. nuttallii* e *I. storkii* (Fig. 1D). Estrías regulares, continuas, que ocupan el centro o la totalidad de las paredes externas de las células epidérmicas, son características de *I. adspersa* (Fig. 3B), *I. boryana* (Fig. 2C, D), *I. longissima*, *I. novo-granadensis* (Fig. 3A), *I. setacea* (Fig. 3E), *I. velata* subsp. *velata* (Fig. 2E, F) e *I. velata* subsp. *asturicensis*. Las estrías más regulares, dispuestas siempre en un grupo central en la pared externa, son típicas de *I. boryana*, *I. longissima* e *I. velata* y las más finas, dispuestas homogéneamente en toda la pared externa, las de *I. setacea*. En *I. adspersa* e *I. novo-granadensis* las estrías están muy próximas, son gruesas y ocupan también toda la pared externa. Estrías cortas y prominentes, continuas o interrumpidas, se han observado en *I. durieui* (Fig. 3F), *I. histrix* e *I. lacustris* (Fig. 3C, D); en las dos primeras además, con abundantes verrugas cuticulares que están ausentes en *I. lacustris*.

Las paredes de contacto longitudinales de las células epidérmicas pueden desarrollar cuñas cuticulares externamente prominentes y muy engrosadas (Fig. 2B), que aparecen como un gran pliegue longitudinalmente continuo en *Isoetes adspersa*, *I. anatolica*, *I. andina*, *I. boryana*, *I. durieui*, *I. histrix*, *I. howellii*, *I. killipii*, *I. lacustris*, *I. novo-granadensis*, *I. nuttallii*, *I. piedmontana*, *I. setacea* e *I. storkii*. En el resto de las especies no hay cuñas externas sobresalientes.

Modelos epidérmicos. En vista superficial, las células epidérmicas tienen paredes rectas y se disponen con un modelo poligonal en todos los taxones estudiados. La epidermis de los microfilos puede presentar variaciones en la relación l/a celular y en el tamaño de las células.

Las células epidérmicas pueden ser desde casi isodiamétricas, con relación l/a celular 1:1, hasta rectangulares y angostas, con relación l/a 14:1 (Tabla 1). Las relaciones l/a celulares más bajas, entre 1:1 y 1.5:1 se encontraron en *Isoetes boryana* (Fig. 4F); relaciones l/a celulares entre 2:1 y 4:1 se encontraron en *I. adspersa* (Fig. 4K), *I. anatolica*, *I. boliviensis* (Fig. 4L), *I. echinospora*, *I. lechleri* (Fig. 4B), *I. longissima*, *I. malinverniana* (Fig. 4H), *I. novo-granadensis* (Fig. 4G), *I. storkii* (Fig. 4A), *I. velata* subsp. *velata*, *I. velata* subsp. *asturicensis*; entre 5:1 y 7:1 en *I. andina* (Fig. 4C), *I. killipii* (Fig. 4D, E), *I. nuttallii*, *I. orcuttii* e *I. setacea*; y finalmente, las relaciones l/a celulares mayores, entre 8:1 y 14:1 se observaron en *I. brochonii*, *I. durieui*, *I. engelmannii* (Fig. 4I), *I. histrix*, *I. howellii*, *I. lacustris*, *I. melanopoda* (Fig. 4M, N), e *I. piedmontana* (Fig. 4J).

En la epidermis pueden aparecer al azar células o grupos celulares con paredes más engrosadas. Estos grupos están formados por unas 3–8 células, con paredes más gruesas que las de células adyacentes y suelen contener taninos. Se intercalan entre las células epidérmicas comunes y se aprecian con escaso aumento o con microscopio estereoscópico. Se observaron como rasgo muy característico y son abundantes en *Isoetes brochonii*, *I. lacustris* e *I. lechleri* (Fig. 4B), pero aparecen, más escasos, en otras especies, como *I. adspersa*, *I. longissima* e *I. velata*.

Los microfilos de *Isoetes histrix* se destacan por los márgenes papilosos (Prada & Rolleri, 2003). Las células de estos márgenes se observan en superficie como pequeños dentículos romos. *Isoetes durieui*, una especie similar a *I. histrix* en la ornamentación cuticular, tiene márgenes formados por células más

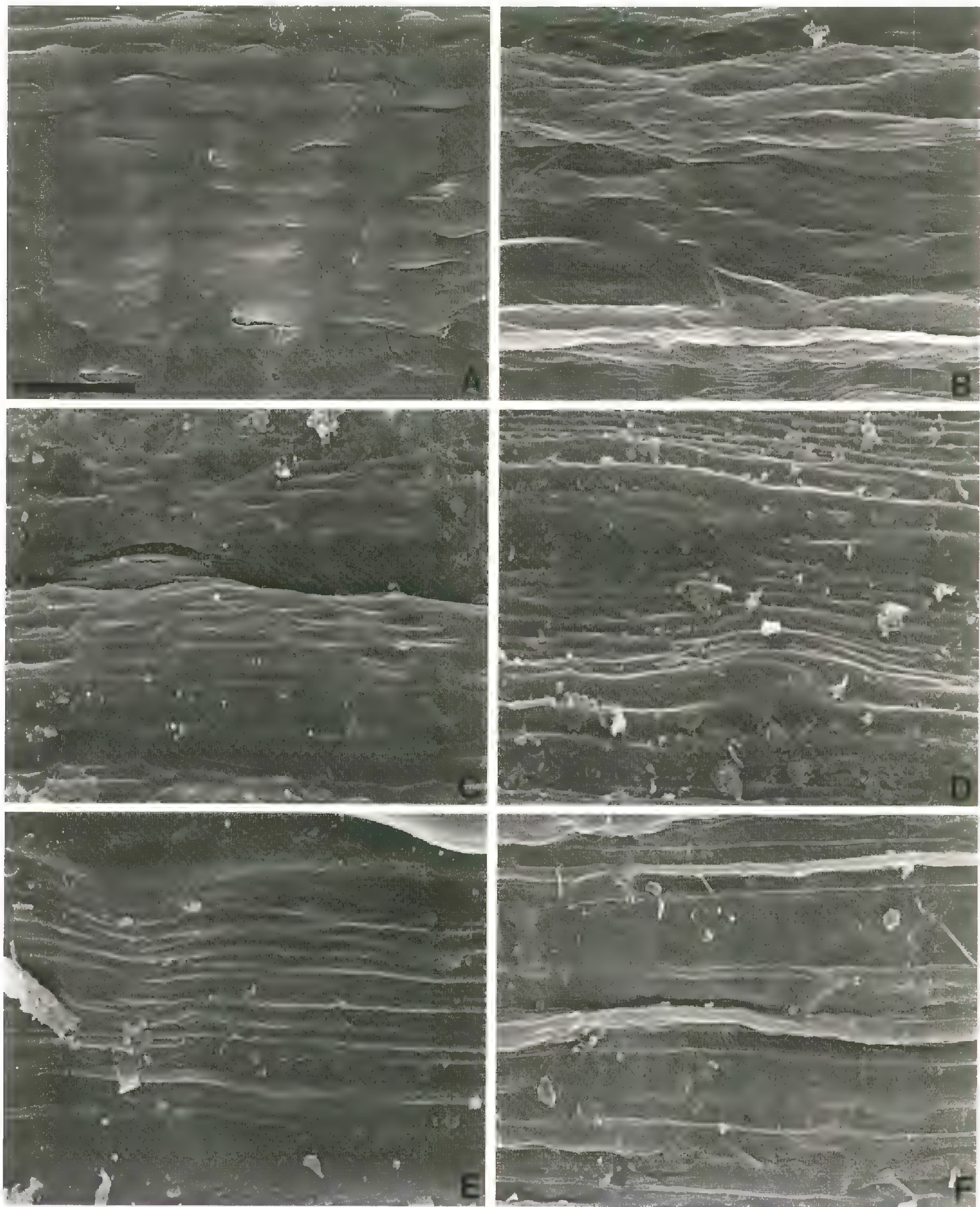


Figura 1. Ornamentaciones cuticulares en especies de *Isoetes*. —A. *I. piedmontana*, cutícula lisa. —B. *I. echinospora*, cutícula irregularmente engrosada, sin estrías definidas. —C. *I. anatolica*, cutícula lisa con cuñas cuticulares sobresalientes. —D. *I. storkii*, cuñas cuticulares sobresalientes y cutícula con estrías irregulares. —E. *I. brochonii*, cutícula con estrias irregulares. —F. *I. killipii*, cuñas cuticulares sobresalientes y cutícula con estrías irregulares. Escala: 50 µm en A, C, F; 20 µm en B; 10 µm en D, E.

engrosadas pero no son papilosos ni sobresalientes y el carácter se aprecia mejor en corte transversal.

Estomas. Los microfilos de las especies estudiadas son anfistomáticos o carecen de estomas. La ausencia de estomas se registró en algunas especies acuáticas o que viven permanentemente sumergidas, como *Isoetes brochonii*, *I. lacustris* e *I. lechleri*. Tampoco se presentan estomas o son muy escasos en algunas especies de los páramos, como *I. andina*, *I. boliviensis*,

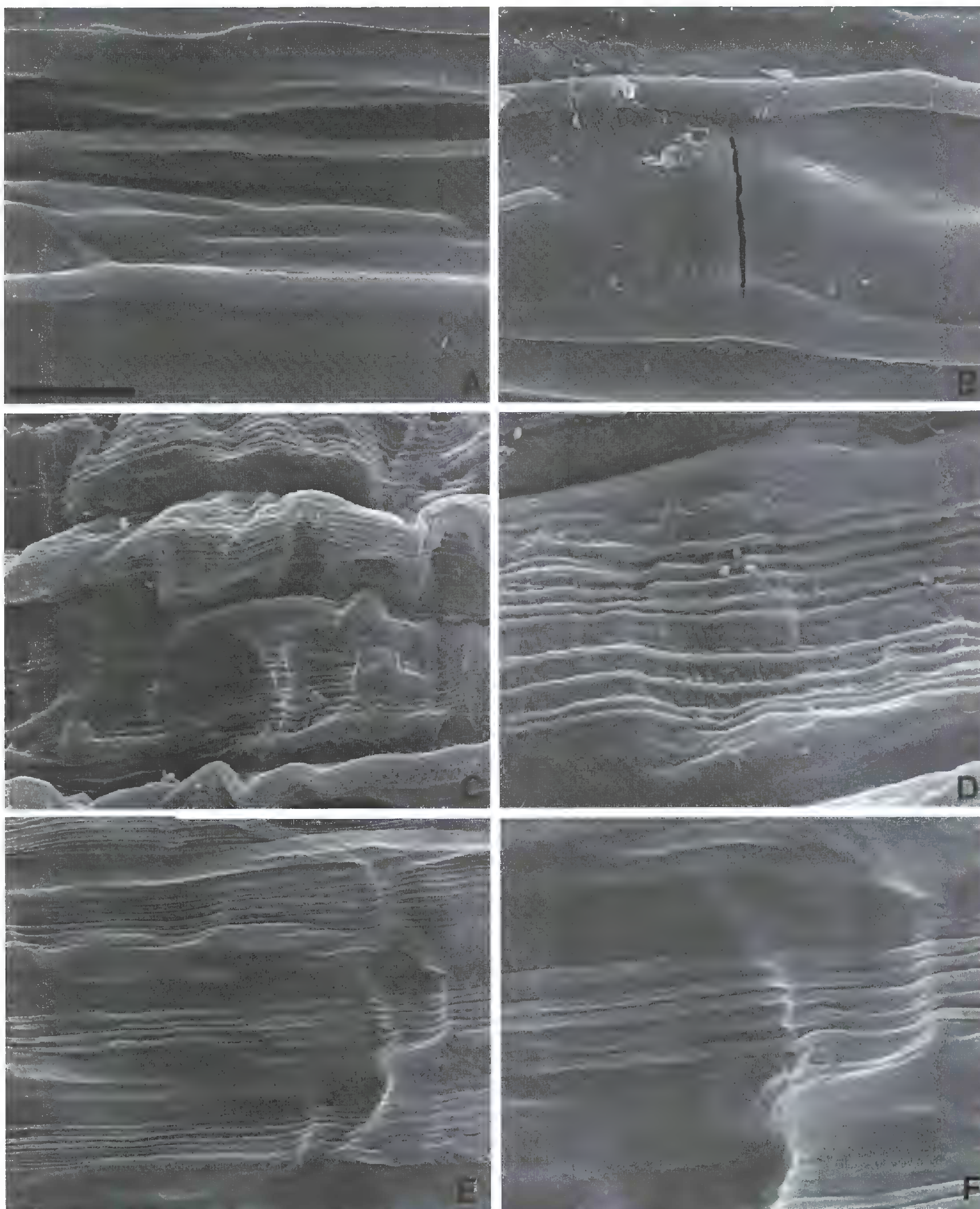


Figura 2. Ornamentaciones cuticulares en especies de *Isoetes*. —A. *I. andina*, cuñas cuticulares sobresalientes y cutícula con estrías irregulares. —B. *I. andina*, detalle de cuñas cuticulares. —C. *I. boryana*, cutícula estriada. —D. *I. boryana*, detalle de estrías regulares y paralelas. —E. *I. velata*, cutícula regularmente estriada. —F. *I. velata*, detalle de estrías centradas en pared externa. Escala: 20 μm en A, B, C, E; 10 μm en D, F.

I. killipii, *I. novo-granadensis* e *I. storkii*. En *I. killipii* los estomas están restringidos al tercio apical de las hojas y tal vez esto se relacione con el grado de emergencia de las mismas.

En la mayoría de las especies los estomas se distribuyen en dos bandas adaxiales y dos abaxiales a lo largo de toda la hoja. El número de hileras de estomas en las bandas puede variar entre 4–5(7)

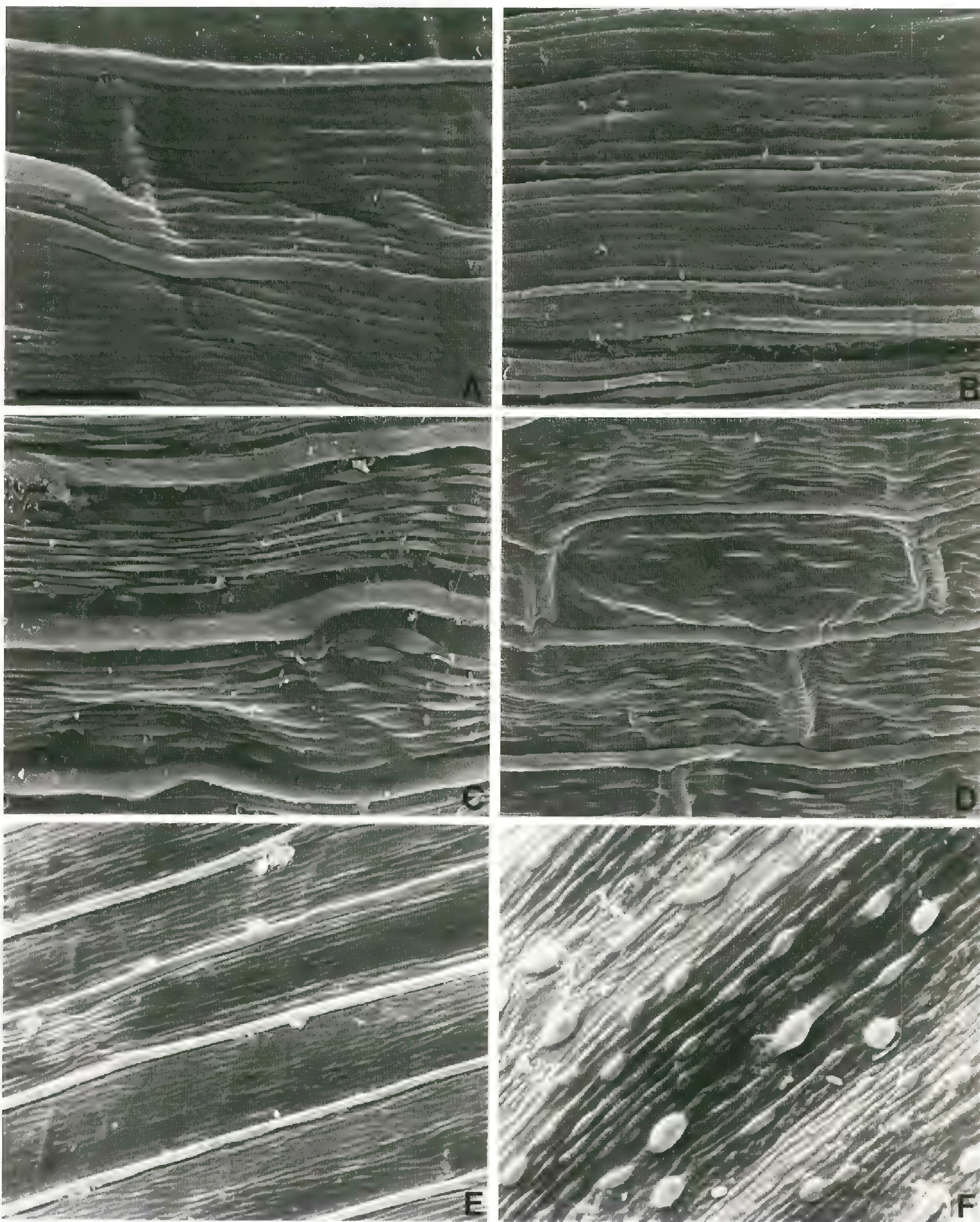


Figura 3. Ornamentaciones cuticulares en especies de *Isoetes*. —A. *I. novo-granadensis*, cuñas cuticulares sobresalientes y cutícula con estrías gruesas. —B. *I. adspersa*, cuñas cuticulares sobresalientes y cutícula con estrias gruesas. —C, D. *I. lacustris*, cuñas cuticulares sobresalientes y cutícula con estrías irregulares, gruesas y discontinuas. —E. *I. setacea*, cuñas cuticulares regulares prominentes y cutícula con estrías irregulares, muy finas y discontinuas. —F. *I. durieui*, cutícula con estrías gruesas, discontinuas y verrugas cuticulares. Escala: 10 µm en A, 50 µm en B; 20 µm en C, D; 15 µm en E, F.

hileras en las bandas adaxiales y 2–3(4) hileras en las abaxiales. Las células epidérmicas de las bandas estomáticas suelen tener menor relación l/a celular que las del resto de la epidermis.

Los estomas adultos tienen contorno casi orbicular en *Isoetes anatolica* e *I. boryana*, o contorno elíptico angosto en las restantes especies, en las que son 2–4 veces más largos que anchos. Tienen 4–8 células

Tabla 1. Caracteres foliares en especies de *Isoetes*.

Especie	Rce (1)	Rcv (2)	Dimensiones estomas (3)	PIP (4)	Colénquima (5)	Ploidía (6)
I. adspersa	3–4:1	12–13:1	(53) 60 (70) × (22) 25 (28)	v	haces	sin datos
I. anatolica	3:1	sin velo	(50) 54 (58) × (32) 35 (38)	f, c	haces	sin datos
I. andina	5:1	3:1	sin estomas	v	haces + chc	sin datos
I. boliviensis	1:1	1:1	(45) 50 (60) × (12) 15 (30)	sin PIP	sin col.	2*x* (Hickey, 1984)
I. boryana	1.5:1	4:1	(47) 57 (63) × (33) 38 (42)	sin PIP	haces	4*x* (Prada, datos no publicados)
I. brochonii	10–14:1	1:1	sin estomas	v, f	sin col.	12*x* (Taylor & Hickey, 1992)
I. durieui	6–9:1	2:1	(65) 70 (80) × (27) 33 (49)	v, f	haces	10*x* (Giovannini et al., 2001)
I. echinospora	3–4:1	3:1	sin estomas	sin PIP	haces	2*x* (Kay, 1974; Prada, 1979b; Taylor & Luebke, 1988)
I. engelmannii	8–9:1	4:1	(58) 62 (65) × (28) 31 (33)	v	sin col.	2*x* (Mathews & Murdy, 1969; Winstead & Musselman, 1994; Bar & Musselman, 1997; Brunton & Britton, 1997)
I. histrix	7–8:1	3:1	(35) 54 (59) × (22) 24 (30)	sin PIP	haces	2*x* (Manton, 1950; Prada, 1983) (*)
I. howellii	9–10:1	4:1	(52) 66 (80) × (20) 24 (30)	v, f	haces	2*x* (Britton & Brunton, 1995)
I. killipii	4.5–5:1	2:1	(62) 73 (87) × (30) 38 (45)	v	sin col.	sin datos
I. lacustris	8–10:1	2:1	sin estomas	v, f	sin col.	10*x* (Rychlewski & Jankun, 1972; Kott & Britton, 1980)
I. lechleri	4:1	3:1	sin estomas	v	clac	4*x* (Jermy, 1990; Troia, 2001)
I. longissima	2–5:1	3–4:1	(50) 63 (70) × (12) 17 (22)	v	haces	4*x* (Prada, 1983)
I. malinverniana	4:1	sin velo	(50) 64 (72) × (22) 30 (37)	f, c	haces	4*x* (Schneller, 1982)
I. melanopoda	7–8:1	5–6:1	(43) 58 (67) × (22) 27 (33)	v	haces + clac	2*x* (Brunton et al., 1996; Taylor et al., 1993)
I. novo-granadensis	3:1	2:1	(57) 68 (80) × (27) 32 (40)	sin PIP	sin col.	12*x* (Hickey, 1984)
I. nuttalii	6–7:1	4:1	(50) 63 (82) × (13) 20 (25)	v	haces	2*x* (Taylor et al., 1993)
I. orcutii	6:1	3:1	(50) 56 (65) × (17) 19 (22)	sin PIP	clac	2*x*, 4*x* (Taylor et al., 1993)
I. piedmontana	8–9:1	1:1	(47) 57 (63) × (22) 26 (30)	v	haces + clac	2*x* (Matthews & Murdy, 1969; Brunton et al., 1996; Taylor et al., 1993)
I. setacea	5–7:1	sin velo	(70) 77 (89) × (34) 38 (42)	v, f	haces	2*x* (Fernández Casas, 1977)
I. storkii	3:1	2:1	sin estomas	v	chc	2*x* (Hickey, 1984)
I. velata asturicensis	2–3:1	4:1	(37) 45 (62) × (13) 20 (30)	v	haces	2*x* (Prada, 1979b)

Table 1. Continued.

Especie	Ree (1)	Rev (2)	Dimensiones estomas (3)	PIP (4)	Colénquima (5)	Ploidía (6)
I. velata velata	2–3:1	1:1	(40) 57 (65) × (15) 16 (20)	v	haces	2*x* (Prada, 1979b)

1. Relaciones l/a celulares de la epidermis.
2. Relaciones l/a celulares del velo.
3. Dimensiones de los estomas (largo por ancho, en µm). Valores de: (promedio de los mínimos de todas las muestras de cada especie) promedio (promedio de los máximos de todas las muestras de cada especie).
4. Tipos de protuberancias intercelulares pécticas (PIP): c, conexiones; f, filamentos; v, verrugas.
5. Colénquima: haces (haces discretos, disposición 3 + 1, 3 + 1 y haces más pequeños, menos de 3 haces, etc.); chc, capa hipodérmica continua; clac, capa hipodérmica lacunar; sin col., sin colénquima de ningún tipo.
6. Se incluye el nivel de plodía, cuando se conoce, con las referencias bibliográficas.

(*) Manton (1950) registra un $x = 10$ [$2n = 20$], aunque en *Isoetes* en general predomina un $x = 11$. En esta especie Prada (1983) registra $2n$ 22. Todos los datos sugieren un diploide.

periestomáticas vecinas indistinguibles morfológicamente de las epidérmicas adyacentes, que se ordenan con disposiciones aproximadamente bipolares, más o menos tetracíticas o hexacíticas, o bien se disponen formando una corona de células más cortas y angostas, de manera más bien actinocítica. Esta última disposición es típica de *I. adspersa*, *I. longissima*, *I. velata* subsp. *velata* e *I. velata* subsp. *asturicensis* y también aparece, aunque puede ser menos clara, en *I. killipii*, *I. malinverniana*, *I. melanopoda*, *I. novogranadensis* e *I. piedmontana*.

Los estomas se diferencian tempranamente y maduran con rapidez. En *Isoetes velata* subsp. *velata* se han encontrado estomas completamente desarrollados en microfilos de 1–2 cm y en plántulas de tamaño aún menor. La orientación bipolar o actinocítica de las células periestomáticas también es temprana. Las escasas iniciales estomáticas y los estomas inmaduros hallados en ejemplares de *I. velata* sugieren que la vía de desarrollo es perígena, algo observado previamente por Prada y Rolleri (2003).

Las dimensiones estomáticas son variables y van desde 45 × 20 µm en *Isoetes velata* subsp. *asturicensis* hasta 77 × 38 µm en *I. setacea* (Tabla 1).

Secciones transversales foliares. Los microfilos son crasos, más o menos triquetros, cuadrangulares o casi teretes. Se atenúan gradualmente con un ápice más fino e igualmente craso, que en ciertas especies puede estar tapizado por una epidermis cuyas células presentan paredes más engrosadas que las restantes epidérmicas del microfilo y que pueden estar coloreadas de castaño.

En la parte media de las hojas el contorno de las secciones es más o menos trapezoidal en *Isoetes adspersa*, *I. boryana* (Fig. 5A), *I. engelmannii* e *I. piedmontana*; es triangular en *I. andina* (Fig. 5O), *I. durieui*, *I. histrix*, *I. melanopoda* (Fig. 5D), *I. malinverniana* (Fig. 5G); triangular a plano-convexa en *I. anatolica*, *I. howellii*, *I. killipii*, *I. novogranadensis* (Fig. 5L), *I. nuttallii*, *I. setacea* e *I. storkii* (Fig. 5H) y es subcuadrangular a subcircular en *I. boliviensis* (Fig. 5Q), *I. brochonii*, *I. echinospora*, *I. lacustris*, *I. lechleri*, *I. longissima*, *I. orcuttii*, *I. velata* subsp. *velata* e *I. velata* subsp. *asturicensis*.

En corte transversal se observan los siguientes tejidos: epidermis, mesofilo y tejidos vasculares. La epidermis es uniestratificada y en especies terrestres o anfibias con secciones foliares más o menos triangulares, los márgenes foliares pueden estar claramente diferenciados y formados por células sobresalientes a papilosas. El mesofilo está constituido por clorénquima y presenta colénquima como tejido de sostén. El grado de desarrollo de ambos tejidos es variable en las especies y en todas se presentan cuatro cámaras aeríferas de posición más o menos simétrica en torno al haz vascular central. Las cámaras aeríferas tienen diafragmas transversales y presentan una endodermis.

Epidermis. Está cutinizada y desarrolla una membrana cuticular de espesor variable. La membrana cuticular está separada de la pared celulósica, que es delgada, por una fina capa péctica, que sólo se aprecia con más de 400 aumentos. La cutícula, de poco espesor, está formada por cutina pura. En muchas especies está ornamentada con estrías o estrías y verrugas, que generalmente involucran sólo la porción más externa de la membrana cuticular. Las capas cuticulares están compuestas por cutina y celulosa, tienen mayor espesor que la cutícula y a veces participan parcialmente en la formación de las verrugas cuticulares.

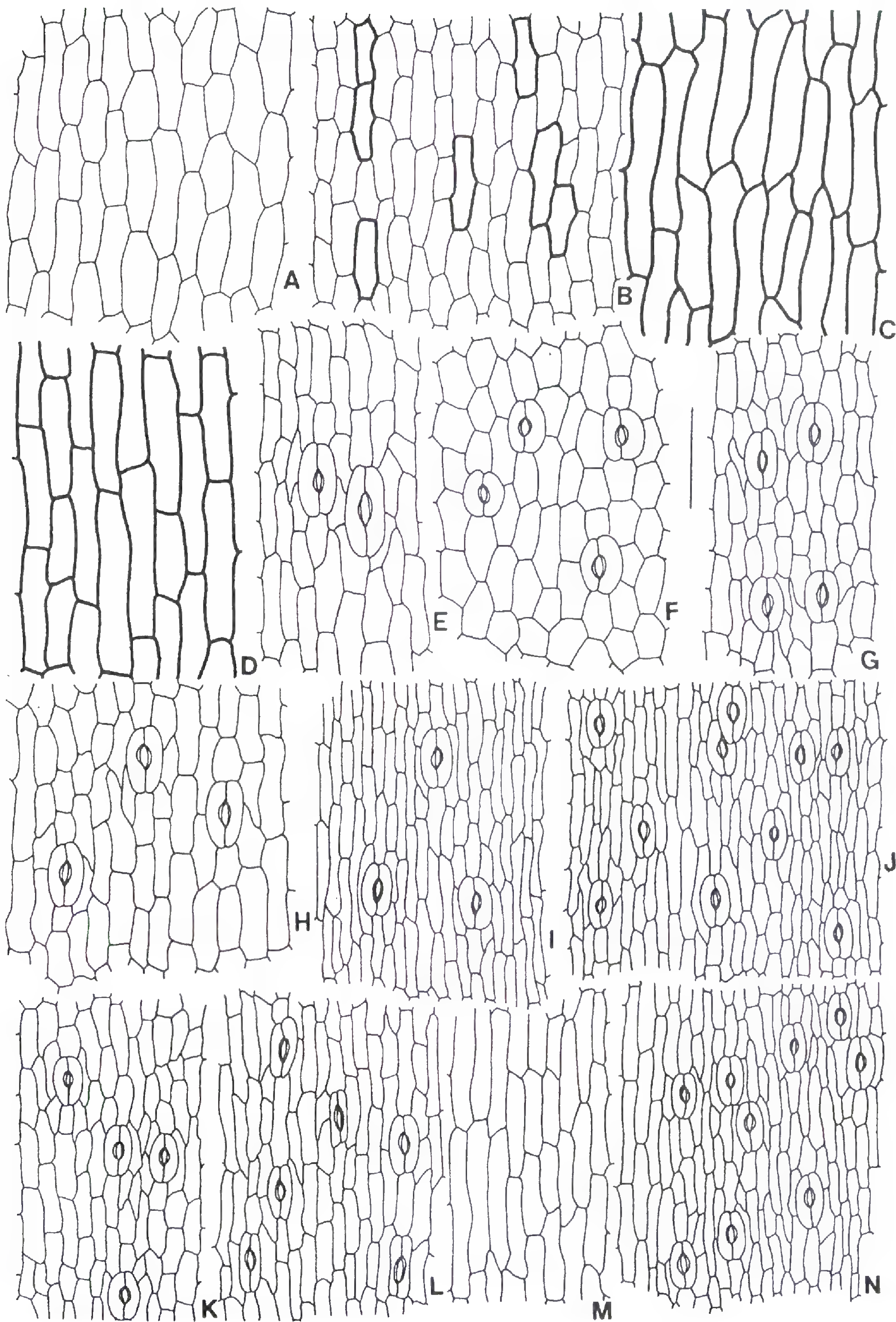


Figura 4. Modelos epidérmicos de los microfilos en especies de *Isoetes*. —A. *I. storkii*. —B. *I. lechleri*. —C. *I. andina*. D, E. *I. killipii*. —D. Parte media. —E. Área apical. —F. *I. boryana*. —G. *I. novo-granadensis*. —H. *I. malinverniana*. —I. *I. engelmannii*. —J. *I. piedmontana*. —K. *I. adspersa*. —L. *I. boliviensis*. M, N. *I. melanopoda*. —M. Área central de la parte media del microfilo. —N. Área marginal. El trazo grueso indica paredes muy engrosadas, tanto en grupos celulares aislados como en toda la epidermis. Escala: 100 µm.

Los mayores espesores de la membrana cuticular, de 5–8 µm, a veces más, son típicos de *Isoetes andina* (Figs. 4C, 5P), *I. killipii* (Figs. 4D, 5M) e *I. storkii* (Fig. 5N). Hay espesores intermedios, de 2–5 µm, en *I. boryana* (Fig. 5K), *I. histrix*, *I. lechleri* (Fig. 5F), *I. malinverniana* (Fig. 5E), *I. melanopoda* (Fig. 5B) e *I. novo-granadensis* (Fig. 5I). En las restantes especies se presentan espesores de 1–2 µm.

Las cuñas cuticulares sobresalientes se aprecian tanto en corte transversal como en superficie (Fig. 2B), mientras que las cuñas que se desarrollan hacia el interior de la epidermis sólo se aprecian en cortes transversales. Se han observado cuñas cuticulares internas profundas en *Isoetes malinverniana* (Fig. 5E), *I. melanopoda* (Fig. 5B) e *I. orcuttii*, todas ellas sin cuñas externas, pero también en algunas especies con cuñas externamente sobresalientes, como *I. boryana* (Fig. 5K), *I. novo-granadensis* (Fig. 5I) e *I. piedmontana* (Fig. 5J).

Sólo presentan márgenes bien definidos las especies con sección foliar más o menos triangular. En estas especies, las células epidérmicas marginales se disponen en 2–5 hileras longitudinalmente alargadas y con las paredes más engrosadas que las restantes epidérmicas; son papilosas en *Isoetes histrix* y prominentes pero no papilosas en las restantes especies. Cuando las secciones transversales foliares son cuadrangulares o casi circulares no se distinguen márgenes.

Mesofilo. Es relativamente simple y está formado por 1–5 capas de clorénquima de posición hipodérmica y 1–2 separando las cámaras aeríferas. La menor cantidad de capas aparece en especies con sección foliar subcuadrangular o subcircular. En microfilos de especies acuáticas con sección foliar subcuadrangular puede haber una sola capa de clorénquima.

Colénquima. En las especies estudiadas de *Isoetes* los microfilos presentan células con engrosamientos pectinados de tres tipos: localizados en toda la pared celular, localizados en paredes radiales y tangenciales externas o bien localizados hacia los espacios intercelulares. Todos estos engrosamientos se detectan mediante TBO, en cortes transversales y su naturaleza péctica se evidencia claramente por su reacción de color rosa ante dicho colorante.

El primer tipo de engrosamientos aparece en células que se agrupan en haces hipodérmicos y constituye lo que siempre se ha considerado colénquima en *Isoetes*. En general hay 3 haces adaxiales y 1 abaxial formados por más de 20 células en corte. Esta distribución puede variar en algunas especies por la formación de haces adicionales más pequeños, constituidos por menos de 10 células en corte. En *I. velata* subsp. *velata* se presentan hasta 30 o más haces pequeños y lo mismo se observó en *I. howellii* e *I. setacea*. El número de haces adicionales puede variar en la misma planta. El colénquima en haces se encuentra en los microfilos de *I. adspersa*, *I. anatolica*, *I. andina*, *I. boryana*, *I. durieui*, *I. echinospora*, *I. histrix*, *I. howellii*, *I. longissima*, *I. malinverniana*, *I. melanopoda*, *I. nuttallii*, *I. piedmontana*, *I. setacea*, *I. velata* subsp. *velata* e *I. velata* subsp. *asturicensis*. En *I. longissima* los haces son discontinuos y la distribución en 3 adaxiales y 1 abaxial puede verse modificada a lo largo del microfilo. En *I. echinospora* los haces de colénquima son extremadamente discontinuos y aparecen erráticamente, a veces uno solo, abaxial.

Los engrosamientos pectinados pueden ocupar la pared tangencial externa y parte de las paredes radiales de las células hipodérmicas del mesofilo. Así, se forma una capa más o menos continua de sostén por debajo de la epidermis, con paredes engrosadas a modo de un colénquima parcialmente laminar cuyas células no se agrupan en haces, como sucede en *Isoetes andina* e *I. storkii* (Fig. 5N), pero en *I. andina* se encuentra este tipo de engrosamiento en las células hipodérmicas situadas entre los 3 haces típicos de colénquima (Fig. 5O).

Los engrosamientos pectinados pueden desarrollarse también hacia los espacios intercelulares, a modo de un colénquima lacunar. Se sitúan en los espacios que dejan entre sí las células del mesofilo, en una o dos capas por debajo de la epidermis. Este tipo de colénquima se presenta en plantas jóvenes y adultas de *Isoetes lechleri* (Fig. 5C, F respectivamente), *I. melanopoda* (Fig. 5B), *I. orcuttii* e *I. piedmontana* (Fig. 5J) y puede estar presente aunque exista un colénquima formando haces típicos, como sucede en *I. melanopoda* e *I. piedmontana*.

No se presenta colénquima en *Isoetes boliviensis*, *I. brochonii*, *I. engelmannii*, *I. killipii*, *I. lacustris* e *I. novo-granadensis* (Tabla 1).

Diafragmas foliares y PIP. Los diafragmas foliares están formados por células globosas, lobuladas o estrelladas que se disponen dejando poros más o menos circulares, elípticos o triangulares. En la superficie y/o en las zonas de contacto de las lobulaciones o brazos de estas células se pueden presentar PIP. Los tipos de PIP descritos hasta el momento para *Isoetes* son verrugas, filamentos y conexiones pécticos. Se presentan verrugas en *I. adspersa*, *I. andina* (Fig. 6A), *I. durieui*, *I. engelmannii*, *I. killipii*, *I. lechleri*, *I. longissima*, *I. melanopoda*, *I. nuttallii*, *I. storkii*, *I. velata* subsp. *velata*, *I. velata* subsp. *asturicensis*; verrugas y filamentos en *I. brochonii*, *I. howellii*, *I. lacustris* e *I. setacea* (Fig. 6B)

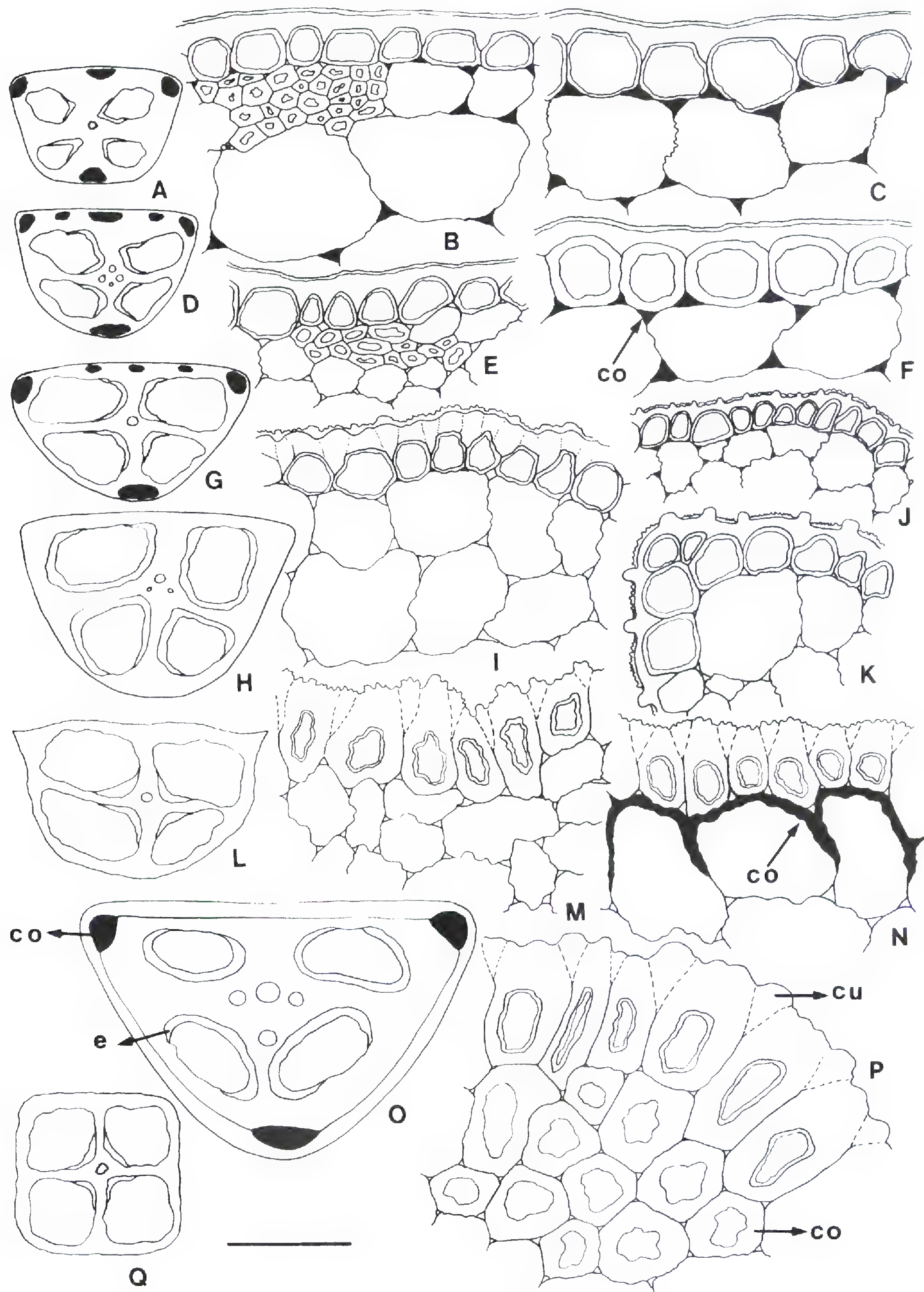


Figura 5. Esquemas y detalles de secciones foliares en especies de *Isoetes*. —A, K. *I. boryana*. —B, D. *I. melanopoda*. C, F. *I. lechleri*. —C. Plantas jóvenes. —F. Plantas maduras. —E, G. *I. malinverniana*. —H, N. *I. storkii*. —I, L. *I. novo-granadensis*. —J. *I. piedmontana*. —M. *I. killipii*. —O, P. *I. andina*. —Q. *I. boliviensis* (similar en *I. lechleri*). co, colénquima; cu, cuñas cuticulares; e, endodermis externa. Escala: 1.5 mm en A, D, G, H, L, O, Q; 50 μm en B, C, E, F, I–K, M, N, P.

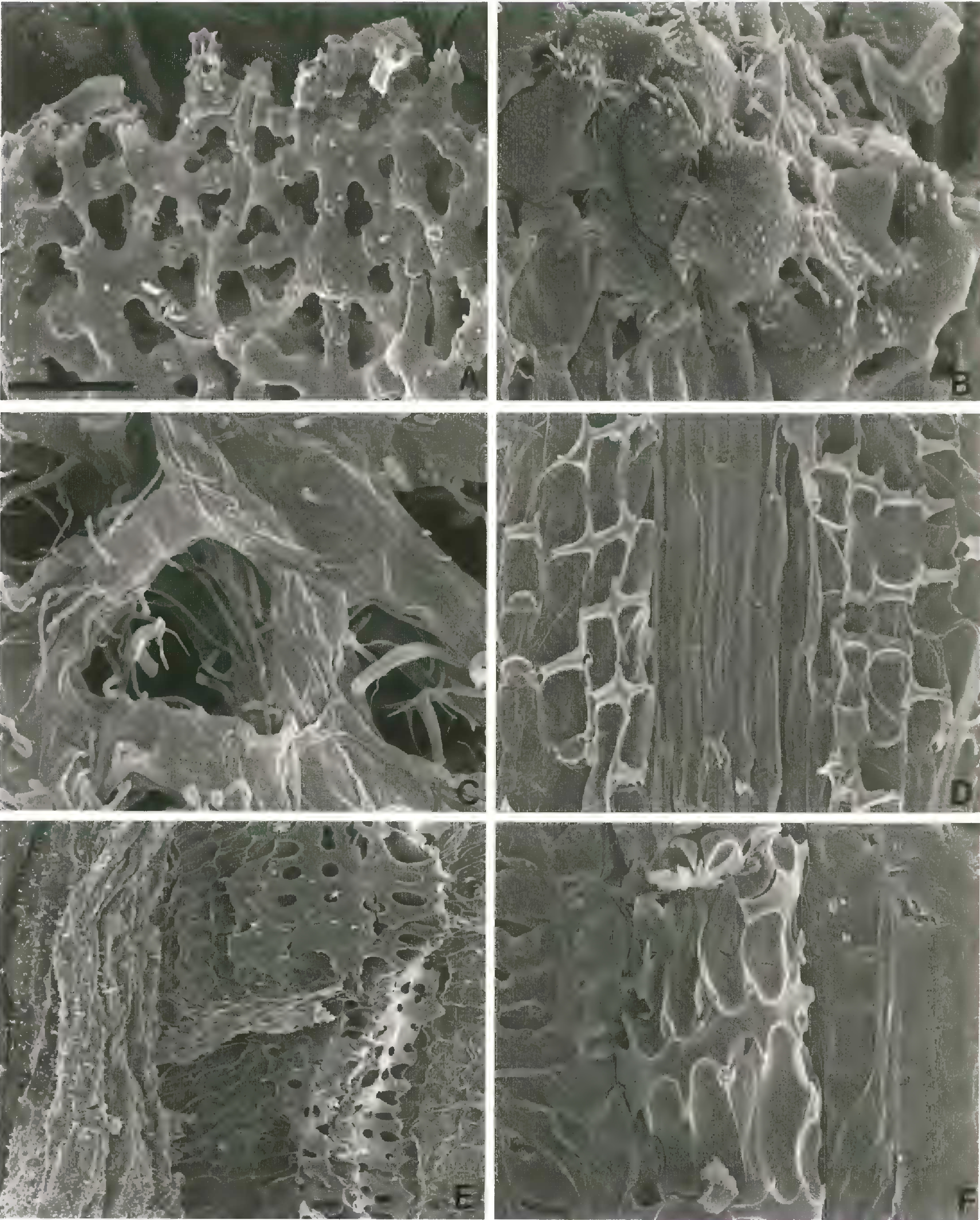


Figura 6. Protuberancias intercelulares pécticas y endodermis externa en especies de *Isoetes*. —A. *I. andina*, células estrelladas de un diafragma foliar con verrugas. —B. *I. setacea*, células lobuladas de un diafragma foliar con verrugas y filamentos. —C. *I. anatolica*, células estrelladas de un diafragma foliar con filamentos y conexiones. —D. *I. velata*, corte longitudinal de microfilo mostrando dos cámaras aeríferas con endodermis externa parcial y células con engrosamientos en U, separadas por el área de la vena media. —E. *I. storkii*, corte longitudinal de microfilo mostrando una cámara aerífera con endodermis externa completa y células con engrosamientos en O. —F. *I. anatolica*, corte longitudinal de microfilo mostrando una cámara aerífera con endodermis externa parcial y células con engrosamientos en O. Escala: 80 µm en A, D, F; 30 µm en B; 15 µm en C; 250 µm en E.

y se encuentran filamentos y conexiones pécticos en *I. anatolica* (Fig. 6C) e *I. malinverniana*. No se observaron PIP en *I. boliviensis*, *I. boryana*, *I. echinospora*, *I. histrix*, *I. novo-granadensis* e *I. orcuttii* (Tabla 1). *Isoetes histrix* presenta ocasionales verrugas pécticas en las paredes de la epidermis que dan hacia las cámaras aeríferas y las especies con verrugas en las células de los diafragmas pueden presentarlas igualmente en las paredes de las células del mesofilo que dan hacia esas cámaras. Las PIP se detectan fácilmente mediante el TBO en cortes transversales o arrancados de mesofilo; su naturaleza péctica se pone de manifiesto por su reacción de color rosa intenso con el colorante mencionado.

Endodermis. En todas las especies estudiadas se presentan dos endodermis foliares: una situada en la zona del haz vascular, la endodermis interna o de los canales intrastelares y otra en la porción del mesofilo que da hacia las cámaras aeríferas, la endodermis externa o de las cámaras. Ambas tienen desarrollo variable en relación con el grado de engrosamiento de sus paredes. La endodermis de las cámaras es parcial, es decir está restringida a la porción curva de la cámara que limita directamente con el área del haz vascular, en todas las especies estudiadas, con excepción de *Isoetes andina*, que presenta una endodermis completa o casi completa. Los engrosamientos de las células endodérmicas son de dos tipos: en U o en O. Los engrosamientos en U se presentan en las endodermis de las cámaras (Fig. 6D) y en la de los canales intrastelares de las especies estudiadas, aunque en sus primeras etapas esta endodermis tiene bandas de Caspary. Los engrosamientos en O solamente se observaron en las endodermis de las cámaras de *I. anatolica* (Fig. 6F), *I. andina* e *I. storkii* (Fig. 6E), en las que pueden ser tan gruesos que se desprenden trozos de pared hacia las cámaras mismas cuando se efectúan cortes transversales.

Area del haz vascular. En el área del haz el tejido vascular es relativamente escaso y está reducido a una venilla media constituida por xilema y floema, rodeada de tejido parenquimático variablemente compacto. El protoxilema se reabsorbe y deja uno o más canales intrastelares en los cuales se desarrolla la endodermis interna con bandas de Caspary. La mayoría de las especies estudiadas presentan un canal intrastelar. Se observaron 4 canales en *Isoetes andina* e *I. melanopoda*, 3 en *I. durieui*, *I. howellii*, *I. setacea* e *I. storkii* mientras que en *I. histrix* el número es variable entre 1 y 5.

LÍGULA Y LABIO

La lígula se encuentra presente en todos los microfilos y es un órgano secretor de mucílago. Se forma tempranamente y alcanza rápidamente su máximo desarrollo; se ha observado que las lígulas de microfilos de 1–2 cm de *Isoetes brochonii*, *I. durieui*, *I. echinospora* e *I. lacustris* tienen ya su tamaño final.

La lígula tiene forma de hoja, de contorno ovado o lanceolado. Lígulas lanceoladas se encontraron en *Isoetes anatolica* (Fig. 7D), *I. andina* (Fig. 7M), *I. durieui* (Fig. 7L), *I. echinospora* (Fig. 7H), *I. histrix* (Fig. 7B), *I. killipii*, *I. malinverniana*, *I. melanopoda* (Fig. 7O), *I. novo-granadensis* (Fig. 7G), *I. nuttallii*, *I. orcuttii* (Fig. 17M), *I. setacea* (Fig. 7A) e *I. velata* (Fig. 7K). Lígulas ovadas aparecen en *I. adspersa*, *I. boliviensis*, *I. boryana* (Fig. 8K), *I. brochonii* (Fig. 8G), *I. engelmannii*, *I. howellii*, *I. lacustris* (Fig. 8J), *I. longissima* (Fig. 8D), *I. piedmontana* (Fig. 8L) e *I. storkii* (Fig. 8A). Finalmente, la lígula es anchamente ovada a casi semicircular en *I. lechleri* (Fig. 8O).

El área marginal de las lígulas es uniestratificada, pero su anchura varía en las especies. Esta área puede ser activamente secretora, función que se pone de manifiesto mediante el TBO por la reacción de color verde de los núcleos, su posición central en las células y por el color rosa intenso de las paredes de éstas.

Se ha observado variación en la duración y localización de la función secretora de la lígula. En microfilos maduros de algunas especies, las lígulas tienen un área marginal uniestratificada que permanecería secretora hasta la madurez, mientras que las de otras especies tienen una zona marginal que ya no es secretora. El cese de la función secretora se observa claramente por la posición parietal de los núcleos de las células de la porción marginal de la lígula, cuyas paredes se impregnan de taninos. En otras especies, la función secretora de la zona marginal es más bien efímera y en microfilos maduros sus células aparecen vacías y se esclerosan por completo. En todos los casos y aún en las lígulas con una zona marginal papirácea esclerosada, las células del ápice conservan su función secretora. El ápice de las lígulas suele estar formado por células largas, similares a pelos (Figs. 7C, 8E, H) o células agudas pero no piliformes (Fig. 8B). El margen puede presentar células piliformes (Figs. 7J, 8I, M) o bien células apenas prominentes, como dentículos, más o menos largos, con paredes primarias (Figs. 7E, F, I, 8C, F) o esclerosadas (Figs. 7N, 8N).

Lígulas permanentemente secretoras, con el área de secreción más o menos extensa, apical y marginal, se encontraron en *Isoetes anatolica* (Fig. 7F), *I. boryana* (Fig. 8E, F), *I. histrix* (Fig. 7C), *I. howellii*, *I. lacustris* (Fig. 8M), *I. setacea* (Fig. 7J) e *I. velata* (Fig. 7I). Las lígulas de *I. andina* (Fig. 7N), *I. brochonii* (Fig. 8N) e *I. killipii* se esclerosan tempranamente y sólo

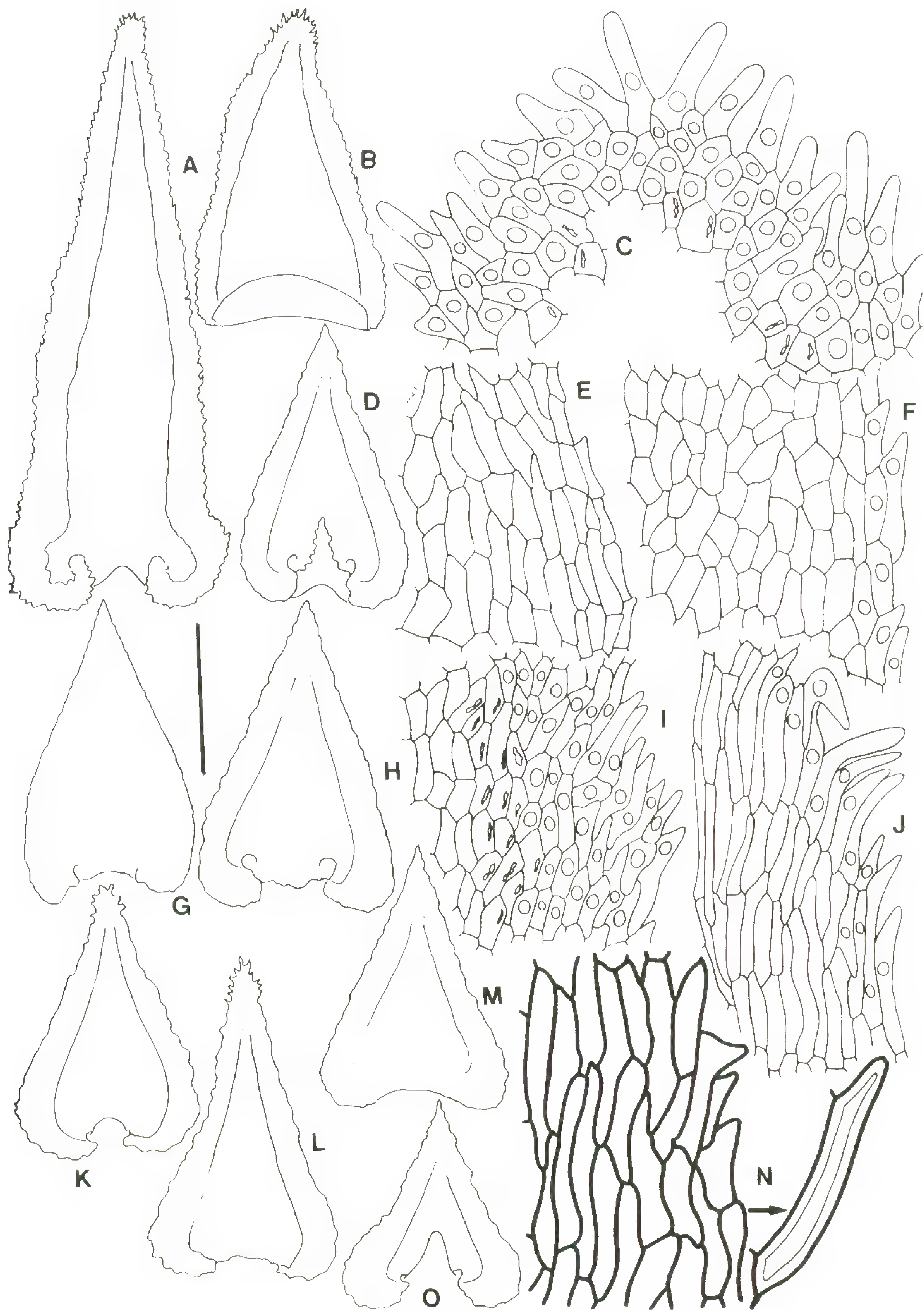


Figura 7. Contornos y modelos epidérmicos de lígulas lanceoladas en especies de *Isoetes*. —A, J. *I. setacea*. —B, C. *I. histrix*. —D, F. *I. anatolica*. —E, O. *I. melanopoda*. —G. *I. novo-granadensis*. —H. *I. echinospora*. —I, K. *I. velata*. —L. *I. durieui*. —M, N. *I. andina*. Las células con núcleos ilustrados corresponden al área secretora; los núcleos contraídos indican el área donde la secreción cesa; si no hay función secretora no se han ilustrado núcleos. El trazo grueso en las paredes indica células lignificadas. Escala: 3 mm en A; 1 mm en B, D, G, H, K, L, M, O; 150 µm en C, E, F, I, J; 50 µm en N.

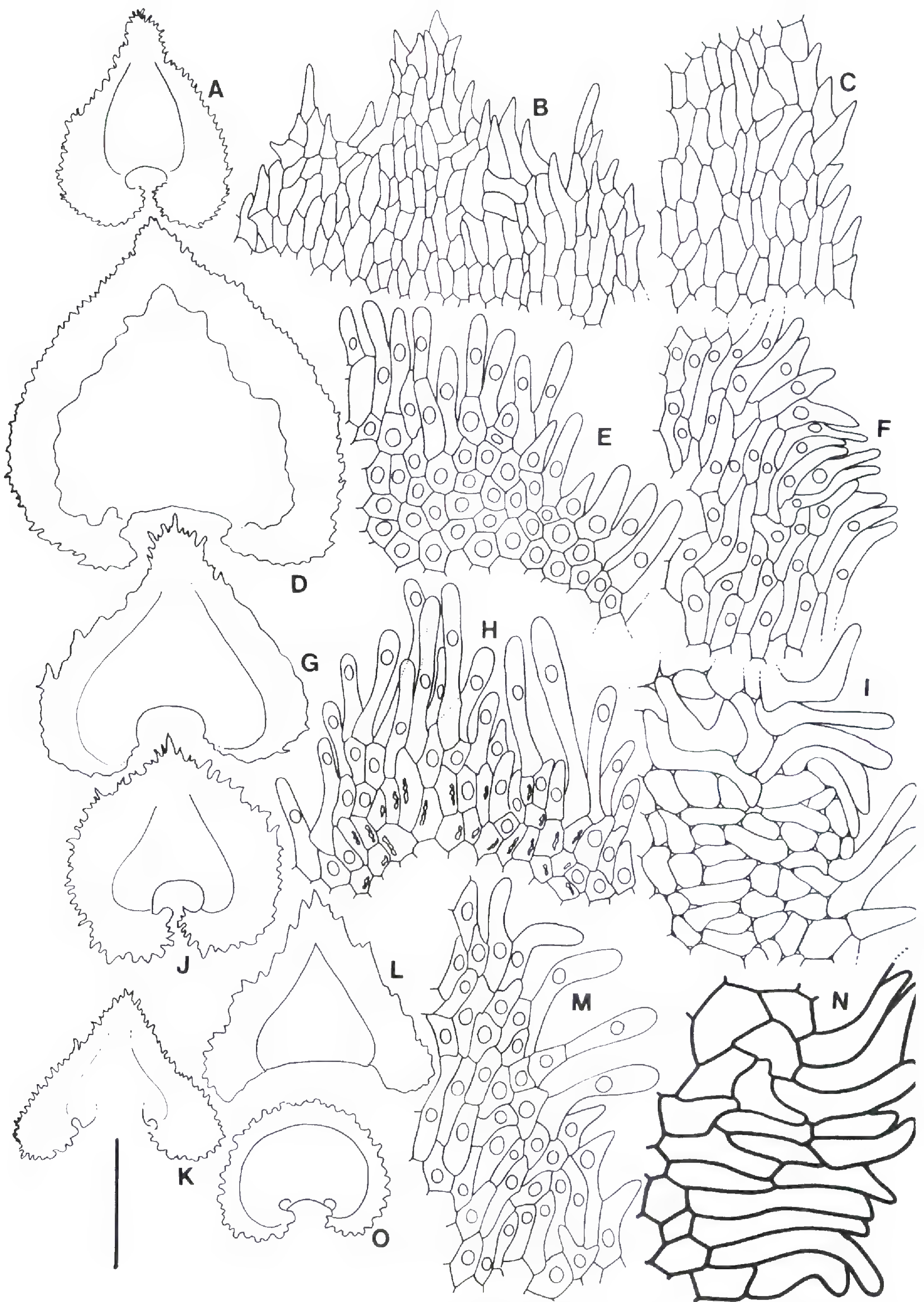


Figura 8. Contornos y modelos epidérmicos de lígulas ovadas en especies de *Isoetes*. —A, I. *I. storkii*. —B, C, L. *I. piedmontana*. —D. *I. longissima*. —E, F, K. *I. boryana*. —G, H, N. *I. brochonii*. —J, M. *I. lacustris*. —O. *I. lechleri*. Las células con núcleos ilustrados corresponden al área secretora; los núcleos contraídos indican el área donde la secreción cesa; si no hay función secretora no se han ilustrado núcleos. El trazo grueso en las paredes indica células lignificadas. Escala: 1 mm en A, D, G, J, K, L, O; 150 µm en B, C, E, F, H, I, M, N.

conservan ápices secretores. En las restantes especies la secreción parece cesar en microfilos adultos.

El área central de las lígulas es pluriestratificada, con 2–3 capas celulares de espesor o, a veces, algo más, con el aspecto de un mesofilo simple (Fig. 9A–F). En el caso de *Isoetes histrix* (Fig. 9A), la epidermis de la lígula se destaca por sus células papilosas en el área central pluriestratificada, un rasgo que no se ha observado en otras especies.

El labio es un órgano carnoso, más bien rígido, resistente, situado por debajo de la lígula, con un desarrollo y forma que pueden variar en la misma planta. Aquí sólo se ha estudiado en *Isoetes setacea* y se ha podido comprobar que es una estructura amilácea, con una epidermis tempranamente cutinizada, casi siempre formada por células isodiamétricas con paredes muy engrosadas dispuestas con modelo poligonal y presenta una organización interna muy sencilla (Fig. 9H). Las células de la epidermis y las internas almacenan almidón de granos simples, más o menos esféricos, con un hilo excéntrico. Estos granos (Fig. 9I) son similares a los que provienen de los amiloplastos del cormo pero son notablemente más grandes. Se acumulan en todas las células del labio, incluidas las epidérmicas, con excepción de las que ocupan una posición abaxial basal (Fig. 9G).

VELO

El velo y el labio son connatos, pero su desarrollo relativo puede variar. El velo se extiende basiscópicamente en forma de un tejido 2–3 estratificado, que puede cubrir totalmente o parcialmente el esporangio y se continúa lateralmente en el tejido del ala. Las células de las capas hipodérmicas pueden contener abundante almidón pero en ellas los granos tienen un tamaño similar a los del cormo.

Todas las especies estudiadas tienen velo excepto *Isoetes anatolica*, *I. malinverniana* e *I. setacea*. El grado de desarrollo del velo ha sido utilizado como rasgo específico, pero aquí se ha visto que su extensión y la consecuente cobertura del esporangio puede variar en microfilos de la misma planta. En *I. histrix* el velo suele ser completo pero ocasionalmente falta en macrosporofilos; en *I. andina* es muy corto pero también puede estar ocasionalmente ausente; en *I. velata* el velo suele ser completo en los macrosporangios y corto o incompleto en los microsporangios.

El modelo epidérmico de la cara adaxial del velo muestra variación específica. Los modelos se caracterizan por las paredes celulares sinuosas o rectas (modelos sinuosos o poligonales), la relación l/a celular y los tamaños celulares. Las células tienen pared primaria celulósica débilmente cutinizada y en algunas especies, como *Isoetes adspersa*, *I. brochonii* e *I. echinospora*, presentan taninos.

Modelos sinuosos se presentan en *Isoetes lechleri* (Fig. 10B), *I. longissima*, *I. nuttallii*, *I. orcuttii*, *I. piedmontana* (Fig. 10A), *I. velata* subsp. *velata* (Fig. 10C) e *I. velata* subsp. *asturicensis*; subsinuosos en *I. adspersa* (Fig. 10H), *I. boliviensis* (Fig. 10E), *I. boryana* (Fig. 10F), *I. echinospora* (Fig. 10D) e *I. melanopoda* (Fig. 10G), y finalmente, modelos poligonales, en *I. andina* (Fig. 11G), *I. brochonii* (Fig. 11B), *I. durieui* (Fig. 11H), *I. histrix* (Fig. 11F), *I. howellii*, *I. killipii* (Fig. 11E), *I. lacustris* (Fig. 11C), *I. novo-granadensis* (Fig. 11A) e *I. storkii* (Fig. 11D).

Las relaciones l/a celulares son 1:1 en *Isoetes boliviensis* e *I. piedmontana*, 2:1 en *I. brochonii*, *I. durieui*, *I. killipii*, *I. lacustris*, *I. novo-granadensis* e *I. storkii*. Relaciones l/a celulares 3:1 son característicos de *I. andina*, *I. echinospora*, *I. histrix*, *I. lechleri* e *I. orcuttii*, 4:1 en *I. boryana*, *I. howellii*, *I. nuttallii* e *I. velata*. Las relaciones l/a celulares más altas, 5–6:1 y 12–13:1, se encontraron en *I. melanopoda* e *I. adspersa* respectivamente (Tabla 1).

PARED ADAXIAL DE LOS ESPORANGIOS

La epidermis adaxial del esporangio puede estar formada por distintos tipos celulares. En ciertas especies está constituida por células que sólo desarrollan pared primaria celulósica débilmente cutinizada, que da reacción de color rosa con el TBO y sin inclusiones detectables por los métodos microquímicos aquí utilizados. En otras especies, algunas de las células epidérmicas contienen taninos, los cuales se detectan porque dan reacción de color verde claro con el TBO, que se atribuye a la presencia de polifenoles. Por último, en otras especies, la epidermis está formada por células con pared secundaria lignificada. La lignina se pone en evidencia por su reacción de color verde intenso hasta azul brillante con el TBO. El color verde de las paredes lignificadas también se debe a polifenoles, y es similar en ligninas y taninos. La fluorescencia verdosa que emiten exclusivamente las paredes lignificadas permite discriminar entre unas y otros.

Modelos epidérmicos de la pared adaxial del esporangio. Los modelos epidérmicos formados por células con pared primaria débilmente cutinizada, dispuestas en grupos definidos, como un parqué y con las células de los distintos grupos contactando entre sí por extremos romos se presentan en *Isoetes boliviensis* (Fig. 12D), *I. boryana* (Fig. 12C), *I. lacustris* (Fig. 13A), *I. longissima* (Fig. 12B), *I. melanopoda* (Fig. 13B), *I. novo-granadensis* (Fig. 12F), *I. nuttallii*, *I. orcuttii*, *I. storkii* (Fig. 12E) e *I. velata* (Fig. 12A).

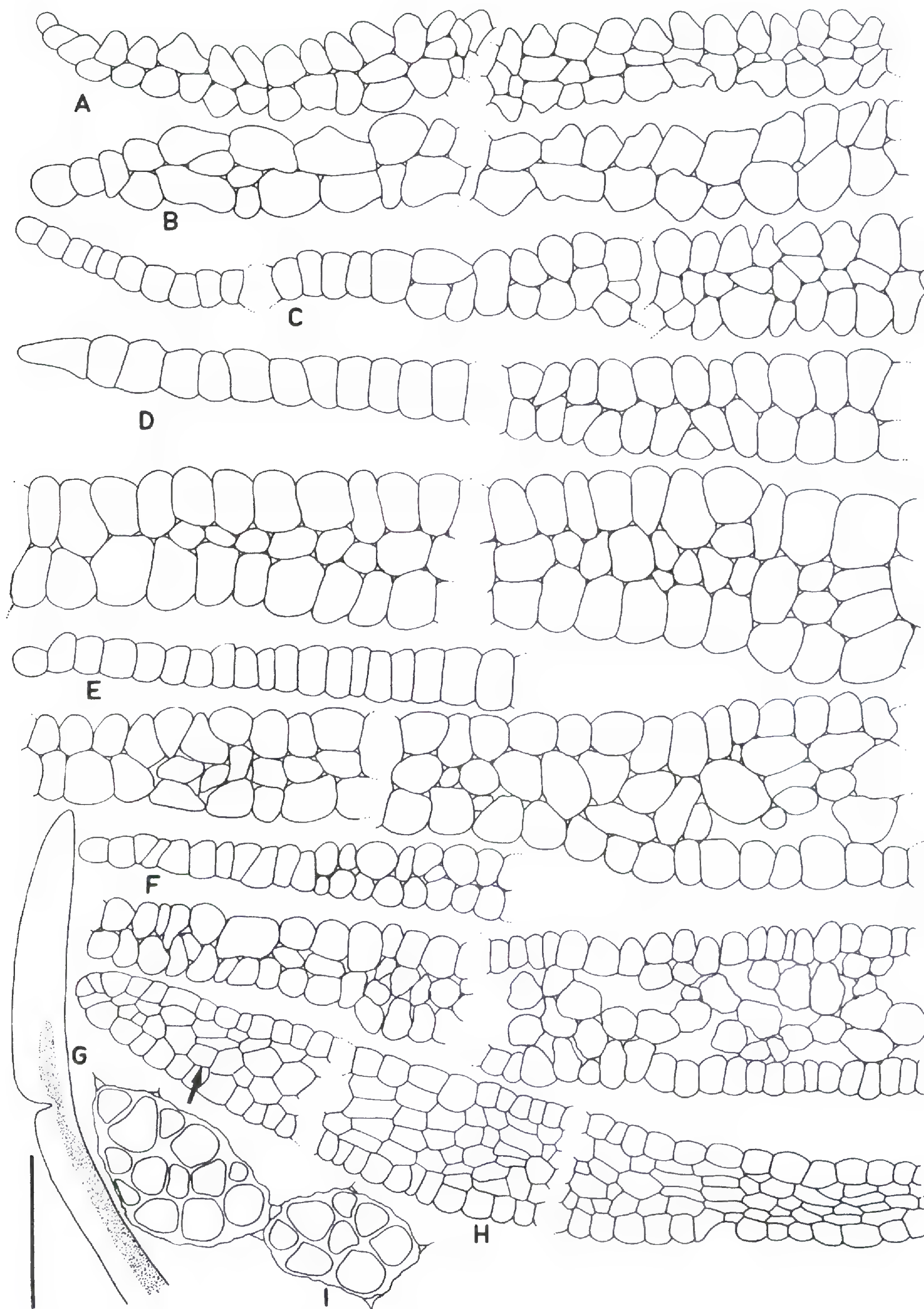


Figura 9. Secciones tranversales de lígulas y labio en especies de *Isoetes*. A–F. Lígulas. —A. *I. histrix*, lígula 3-estratificada con epidermis abaxial y adaxial papilosa. —B. *I. andina*, lígula 2-estratificada. —C. *I. setacea*, lígula 3-estratificada con epidermis abaxial y adaxial subpapilosas. D–F. Lígulas pluriestratificadas, de sección similar a un mesofilo sencillo. —D. *I. storkii*. —E. *I. lechleri*. —F. *I. velata*. G–I. Labio de *I. setacea*. —G. Sección longitudinal del labio completo. —H. Detalle de la anatomía. —I. Células con granos de almidón. Sombreado, área no amilácea del labio. Escala: 150 μm en A–F, H; 1 mm en G; 75 μm en I.

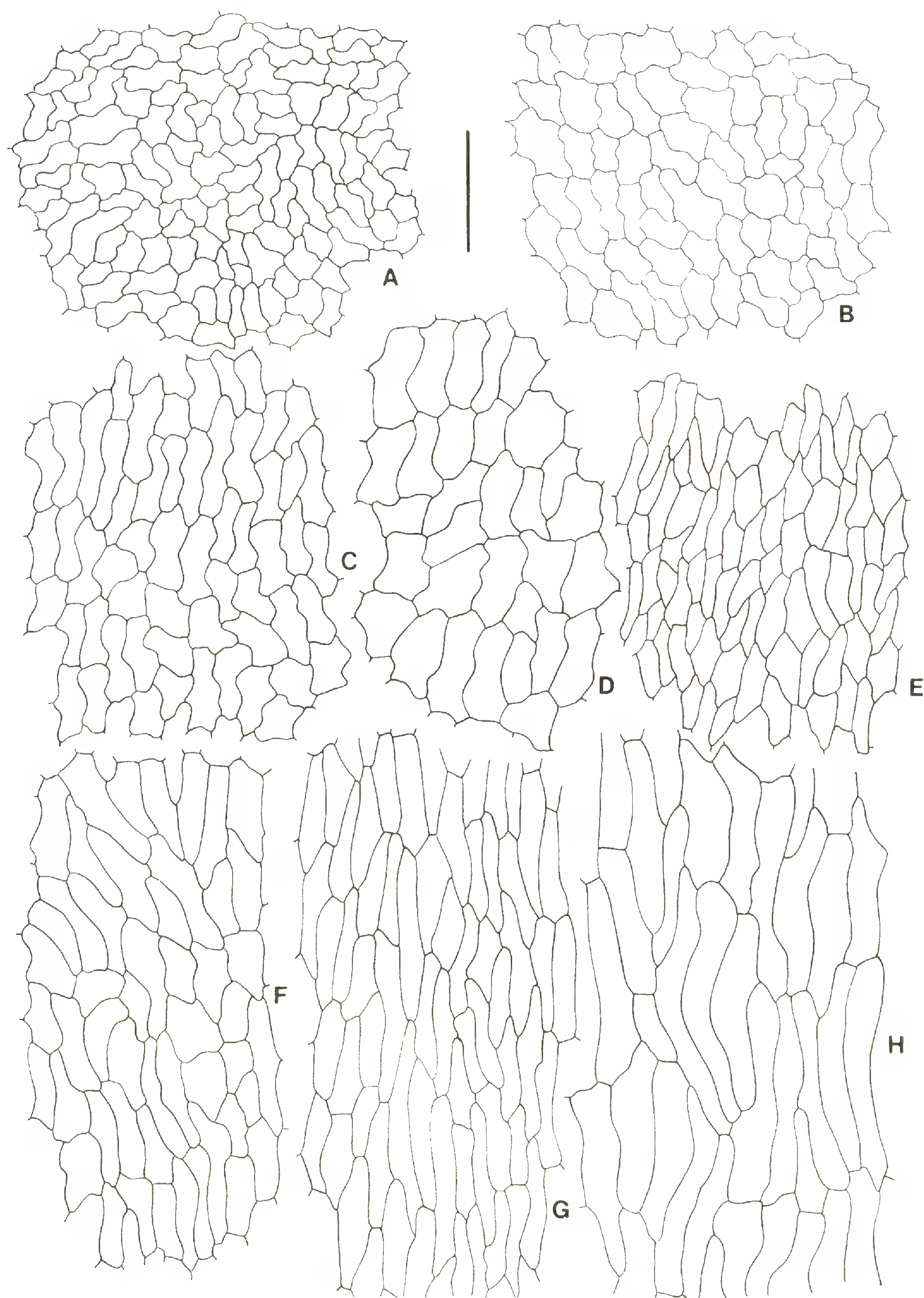


Figura 10. Modelos epidérmicos del velo en especies de *Isoetes*. —A. *I. piedmontana*. —B. *I. lechleri*. —C. *I. velata*. —D. *I. echinospora*. —E. *I. boliviensis*. —F. *I. boryana* (similar en *I. longissima*). —G. *I. melanopoda*. —H. *I. adspersa*. Escala: 100 µm.

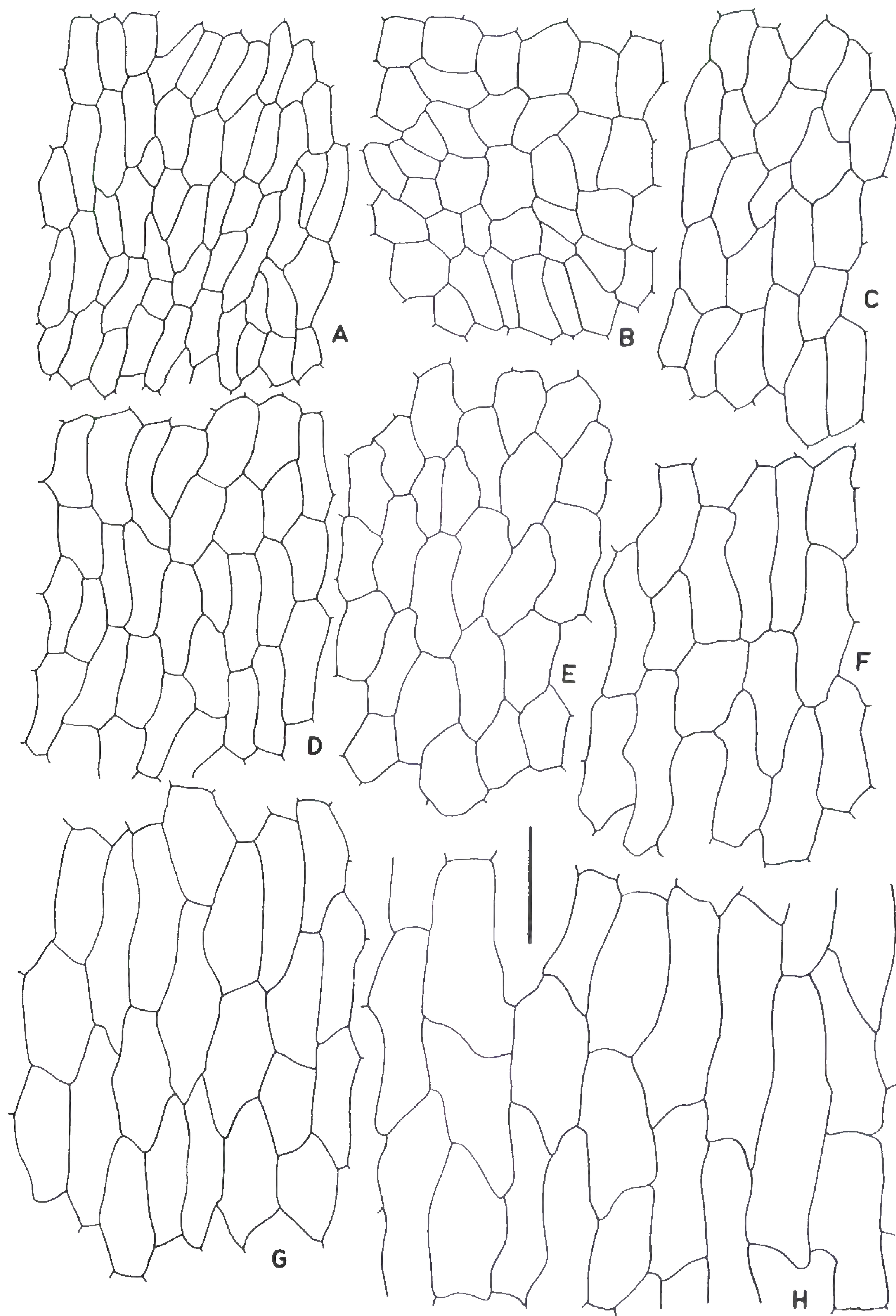


Figura 11. Modelos epidérmicos del velo en especies de *Isoetes*. —A. *I. novo-granadensis*. —B. *I. brochonii*. —C. *I. lacustris*. —D. *I. storkii*. —E. *I. killipii*. —F. *I. histrix*. —G. *I. andina*. —H. *I. durieui*. Escala: 100 μm.

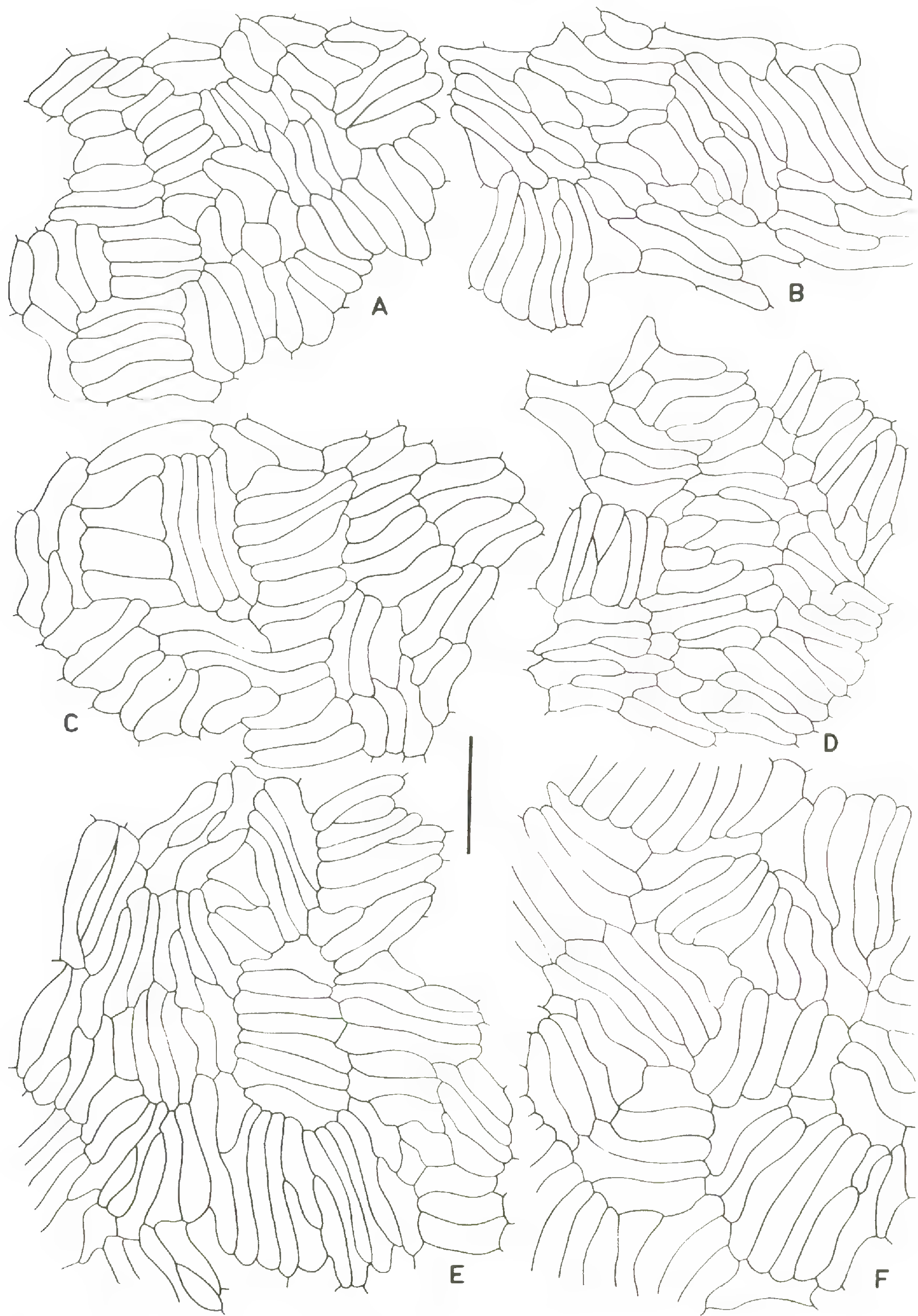


Figura 12. Modelos epidérmicos de la pared adaxial del esporangio en especies de *Isoetes*. Modelo en parqué, células con pared primaria cutinizada. —A. *I. relata*. —B. *I. longissima*. —C. *I. boryana*. —D. *I. boliviensis*. —E. *I. storkii*. —F. *I. novo-granadensis*. Escala: 100 µm.

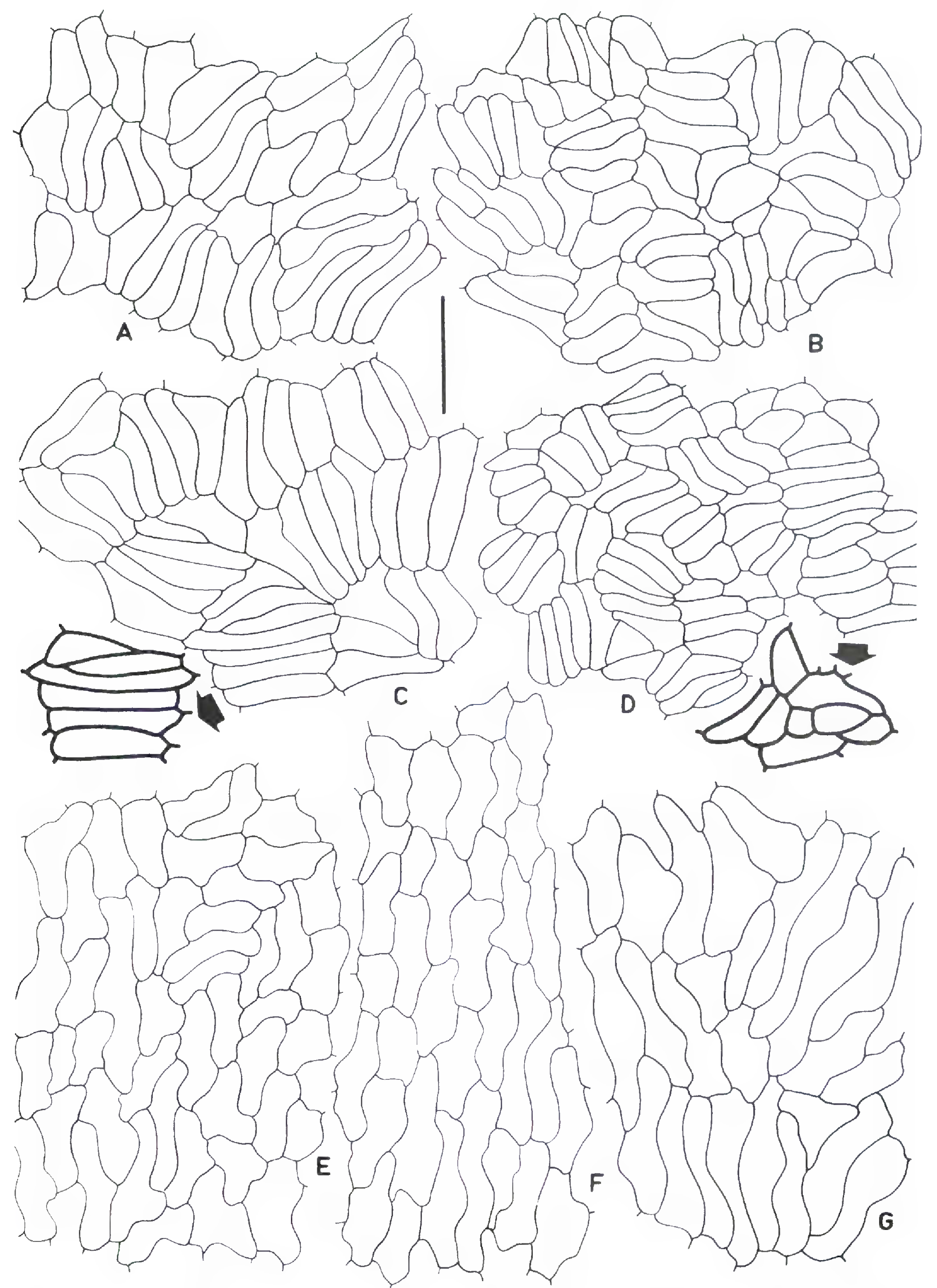


Figura 13. Modelos epidérmicos de la pared adaxial del esporangio en especies de *Isoetes*. A, B. Modelo en parqué, células con pared primaria cutinizada. —A. *I. lacustris*. —B. *I. melanopoda*. —C. Modelo en parqué, células con pared secundaria lignificada, en *I. andina*. —D. Modelo en parqué, células con pared engrosada (cutinizada) no lignificada, en *I. lechleri*. E–G. Modelo subsinuoso no en parqué, células con pared primaria cutinizada. —E. *I. malinverniana*. —F. *I. anatolica*. —G. *I. killipii*. Flechas, detalle de engrosamiento uniforme de la pared celular. Escala: 100 μm.

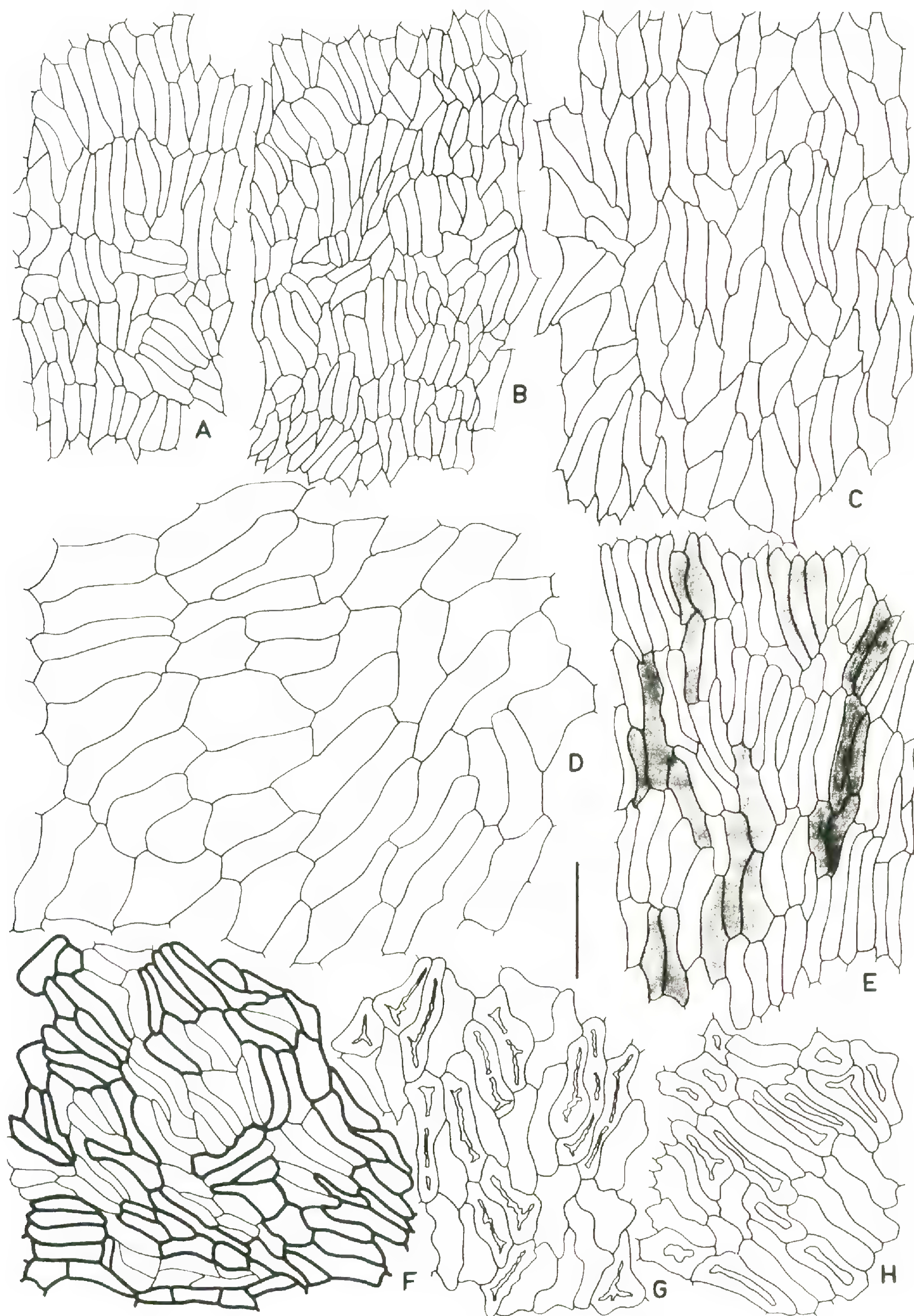


Figura 11. Modelos epidérmicos de la pared adaxial del esporangio en especies de *Isoetes*. A–C. Modelos en parqué, células con pared primaria cutinizada, angulosas. —A. *I. engelmannii*. —B. *I. echinospora*. —C. *I. brochonii*. —D. Modelo poligonal, células con pared primaria cutinizada en *I. durieui*. —E. Modelo en parqué, células con pared primaria tanífera (áreas oscuras), en *I. adspersa*. F–H. Modelo en parqué, células con pared primaria cutinizada y células con pared secundaria lignificada. —F. *I. piedmontana*. —G. *I. histrix*. —H. *I. setacea*. Escala: 100 µm.

Tabla 2. Caracteres de la pared adaxial del esporangio en especies de *Isoetes*.

Con grupos celulares definidos, "en parqué"	Paredes primarias débilmente cutinizadas	Paredes celulósicas delgadas	Los grupos celulares contactan por paredes curvas	*I. boliviensis*, *I. boryana*, *I. lacustris*, *I. longissima*, *I. melanopoda*, *I. novo-granadensis*, *I. nuttallii*, *I. orcuttii*, *I. storkii*, *I. velata*
			Los grupos celulares contactan por paredes agudas	*I. brochonii*, *I. echinospora*, *I. engelmannii*
		Paredes celulósicas engrosadas	Células con taninos	*I. adspersa*, *I. howellii*
			Células sin taninos	*I. lechleri*
	Paredes lignificadas en todas las células o en parches celulares	Todas las células lignificadas		*I. andina*
		Sólo grupos de células lignificadas, formando parches		*I. histrix*, *I. piedmontana*, *I. setacea*
Sin grupos celulares definidos	Modelo epidérmico poligonal			*I. durieui*
	Modelo epidérmico subsinuoso			*I. anatolica*, *I. killipii*, *I. malinverniana*

En *I. lechleri* las paredes son más gruesas que en las otras especies (Fig. 13D). Este modelo se presenta también en *I. adspersa* (Fig. 14E) e *I. howellii*, pero en estas especies hay grupos celulares que están coloreados de castaño por la presencia de taninos. Las células de los distintos grupos contactan entre sí por extremos agudos en *I. brochonii* (Fig. 14C), *I. echinospora* (Fig. 14B) e *I. engelmannii* (Fig. 14A).

Los modelos epidérmicos formados íntegramente por células esclerosadas, dispuestas en grupos definidos, como un parqué, con las células de los distintos grupos contactando entre sí por extremos romos se presentan en *Isoetes andina* (Fig. 13C).

Los modelos epidérmicos formados por grupos definidos de células, no esclerosadas y esclerosadas, como un parqué, se han encontrado en *Isoetes histrix* (Fig. 14G), *I. piedmontana* (Fig. 14F) e *I. setacea* (Fig. 14H).

Las epidermis formadas por células con paredes primarias débilmente cutinizadas, sin esclerosar, dispuestas con modelo subsinuoso, no en grupos definidos como un parqué, se encontraron en *Isoetes anatolica* (Fig. 13F), *I. killipii* (Fig. 13G) e *I. malinverniana* (Fig. 13E). Epidermis de este tipo pero con modelo poligonal y con células notablemente más grandes que en las demás especies, se presenta en *I. durieui* (Fig. 14D).

Si la epidermis adaxial del esporangio está formada solamente por células con pared primaria, la pared se verá externamente sin color salvo que algunas de las células epidérmicas contengan taninos, como es el caso de *Isoetes adspersa* e *I. howellii*. Cuando todas las células o grupos de ellas están lignificadas, los esporangios pueden aparecer uniformemente coloreados (*I. andina*), veteados de castaño (*I. piedmontana*) o no presentar externamente color a pesar de tener paredes lignificadas (*I. histrix* e *I. setacea*).

El color externo no indica ni la naturaleza de las paredes ni las eventuales inclusiones presentes y su ausencia tampoco implica que los modelos epidérmicos coincidan. El método de coloración empleado aquí permite determinar los modelos y la naturaleza de las paredes de las células que los forman (taninos o paredes secundarias lignificadas). Los taninos están ampliamente difundidos en *Isoetes*, se han detectado en las células de la epidermis de los microfilos, en los filopodios, escamas foliares, epidermis de algunos velos y esporangios. En los esporangios con células lignificadas que tienen color castaño externamente visible, es posible que el color se deba a una mezcla de sustancias en las paredes y la coloración con TBO puede coincidir, porque los polifenoles son precursores de taninos y de lignina. Como los taninos no fluorescen, la fluorescencia de estas paredes se atribuye a lignina, pero esto no excluye la presencia de taninos.

No se observaron diferencias apreciables en el modelo adulto de la epidermis de microsporangios y macrosporangios de las especies estudiadas. Los caracteres sobresalientes de la pared adaxial del esporangio se resumen en la Tabla 2.

Ontogenia del modelo epidérmico. Se llevó a cabo por haberse observado que la pared adaxial de ciertos esporangios de la misma planta daba reacciones de color diferente con el TBO. Por esa razón, se estudiaron todos los esporofilos de plantas adultas completas para ver qué modificaciones tenían lugar en el curso del desarrollo de la pared esporangial. El estudio de la ontogenia del modelo se efectuó en *Isoetes setacea* (Fig. 15) e *I. histrix* (Fig. 16).

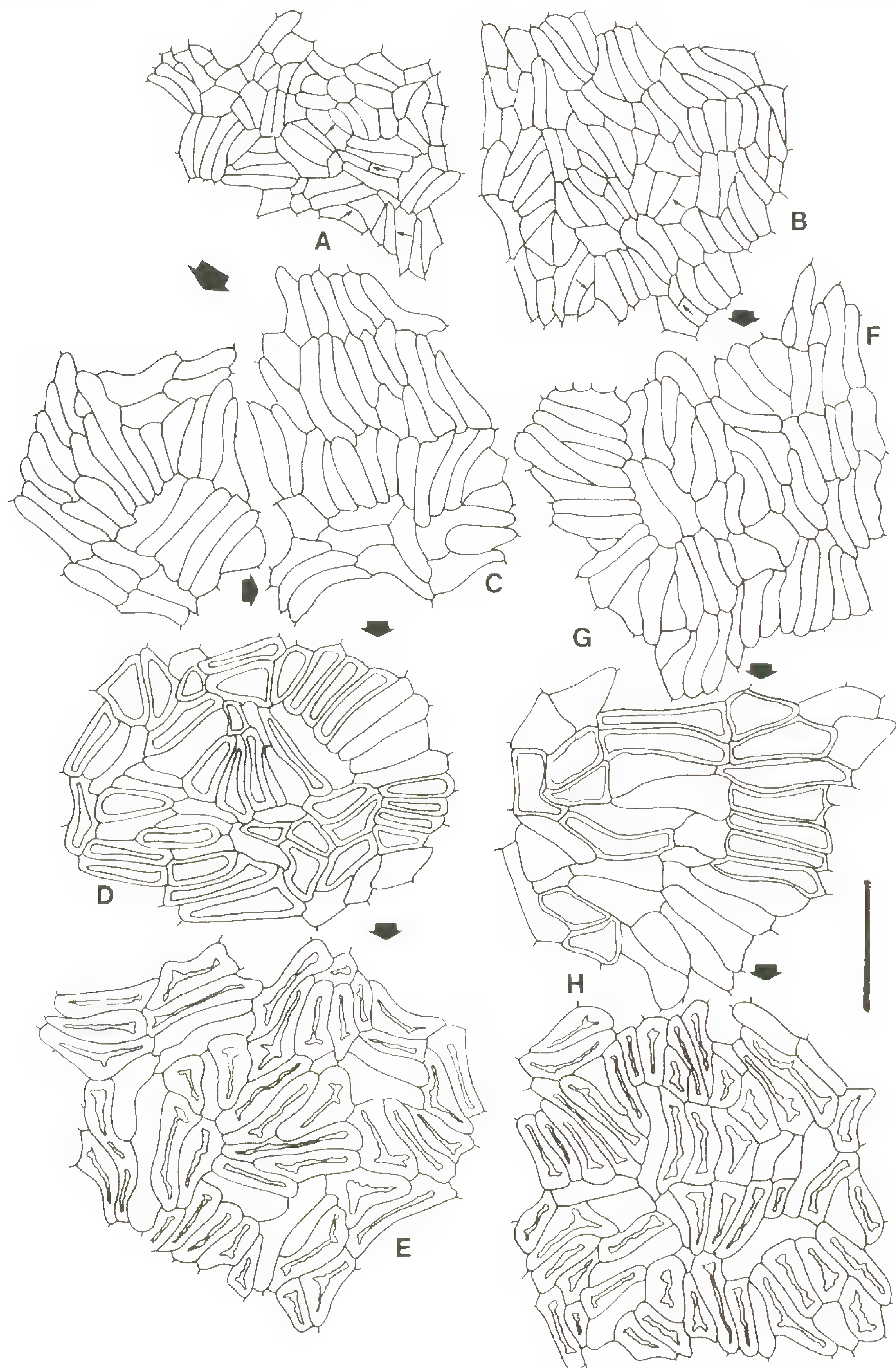


Figura 15. Ontogenia del modelo esporangial en *Isoetes setacea*. —A, B. Epidermis de macrosporangio y microsporangio juveniles más internos, con divisiones recientes y modelo tempranamente establecido. —C. Epidermis de macrosporangio en vías de maduración (contiene esporas inmaduras), con grupos celulares en parqué y células grandes con pared primaria. —D, E. Sucesivas etapas de maduración de la epidermis del macrosporangio: modelo en parqué, células con pared primaria cutinizada y células con pared secundaria lignificada. —F. Epidermis de microsporangio juvenil, modelo en parqué, células con pared primaria. G, H. Epidermis en sucesivas etapas de maduración. —G. Grupos celulares con pared secundaria engrosada no lignificada (microsporangio con esporas inmaduras). —H. Epidermis adulta del microsporangio. Flechas finas, divisiones recientes. Escala: 100 μm.

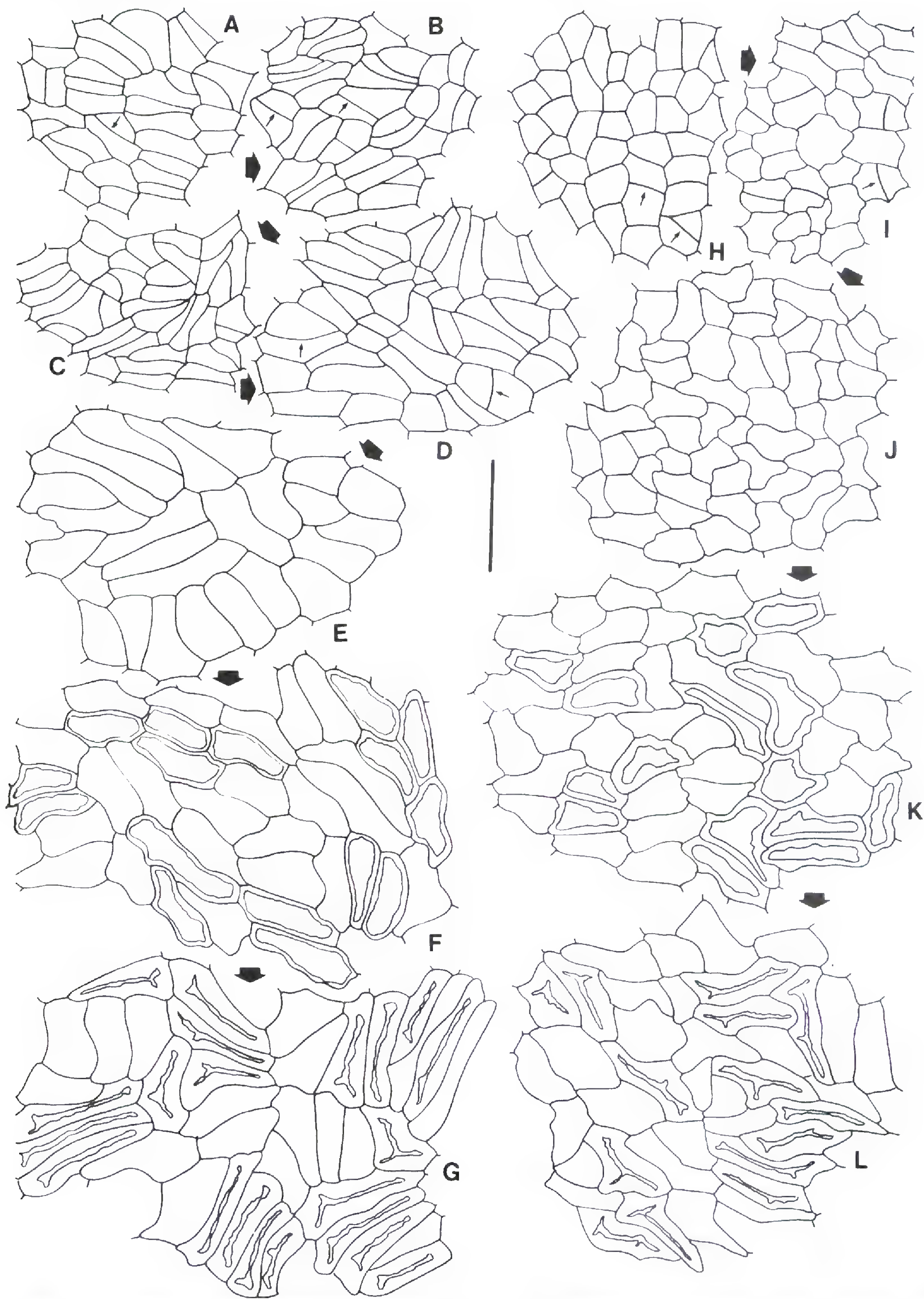


Figura 16. Ontogenia del modelo esporangial en *Isoetes histrix*. —A–D. Epidermis de macrosporangio juvenil más interno con divisiones recientes y modelo establecido tempranamente. —E. Epidermis de macrosporangio en vías de maduración (contiene esporas inmaduras), con grupos celulares en parqué y células grandes con pared primaria. —F, G. Sucesivas etapas de maduración de la epidermis del macrosporangio; modelo en parqué, células con pared primaria cutinizada y células con pared secundaria lignificada. —H, I. Epidermis de microsporangio juvenil, células con pared primaria débilmente cutinizada dispuestas con modelo poligonal. —J. Epidermis de microsporangio juvenil, células con pared primaria débilmente cutinizada dispuestas con modelo subsinuoso. K, L. Epidermis en sucesivas etapas de maduración. —K. Grupos celulares con pared secundaria engrosada no lignificada (microsporangio con esporas inmaduras). —L. Epidermis adulta del microsporangio. Flechas finas, divisiones recientes. Escala: 100 µm.

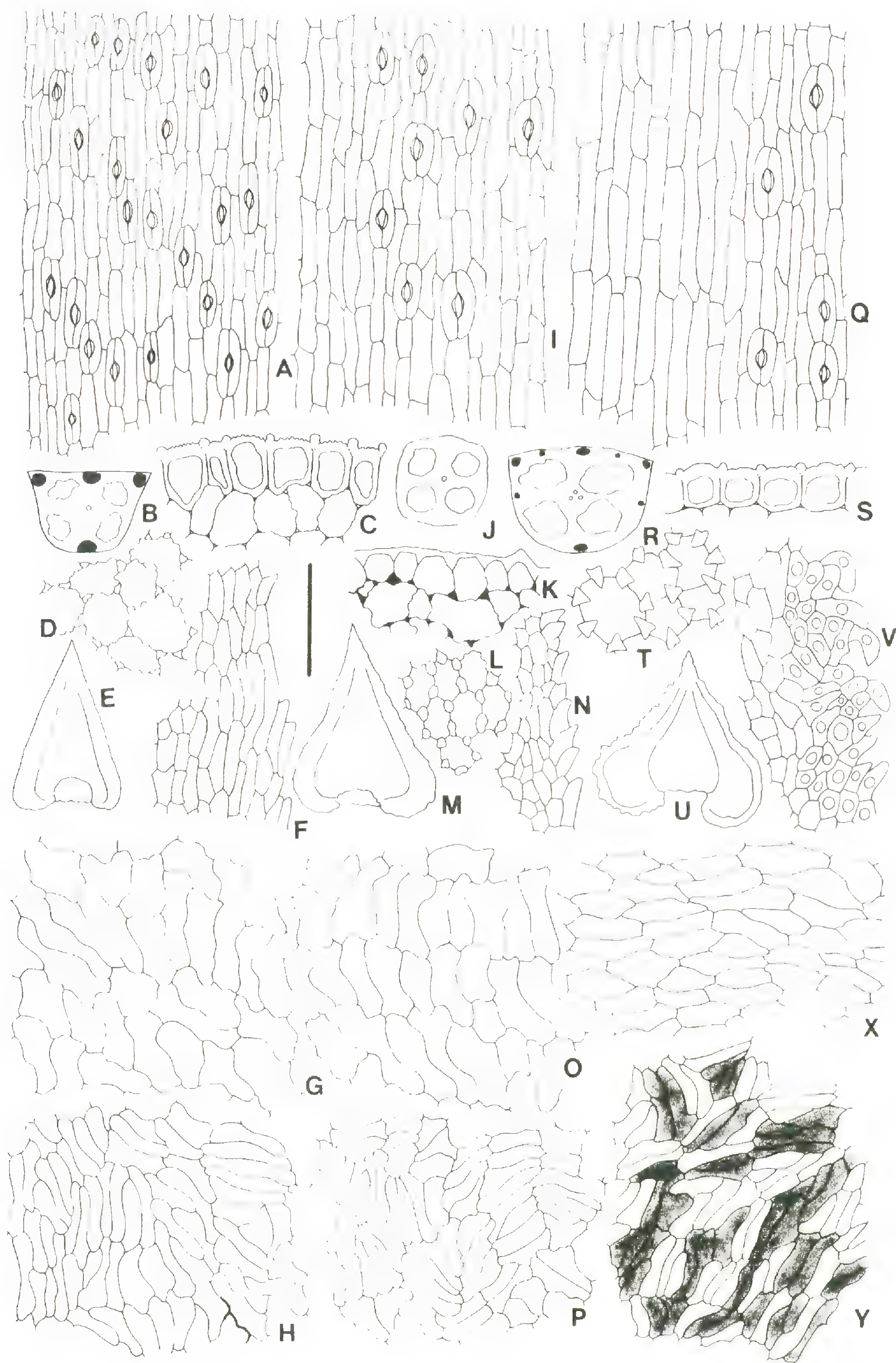


Figura 17. Caracteres foliares en especies de *Isoetes*. —A–H. *I. nuttallii*. —I–P. *I. orcuttii*. —Q–Y. *I. howellii*. A, I, Q. Modelos epidérmicos de los microfilos. B, J, R. Secciones foliares, en B y R, en negro, haces de colénquima. C, K, S. Epidermis de los microfilos en corte transversal, en C y S, con cuñas cuticulares sobresalientes, en K, en negro, colénquima hipodérmico lacunar. D, L, T. Diafragmas foliares. E, M, U. Lígulas. F, N, V. Epidermis del margen de las lígulas, en V, las

En *Isoetes setacea* el modelo epidérmico de los macrosporangios y microsporangios más jóvenes es similar (Fig. 15A, B). En ambos casos la epidermis juvenil muestra etapas iniciales semejantes y sus células tienen paredes primarias celulósicas muy débilmente cutinizadas o sin cutina (no se colorean con TBO). Son poligonales, más largas que anchas y tienen una disposición en grupos algo ordenados que, a la vez que aumentan de tamaño, definen el modelo en parqué típico de la mayoría de las especies descritas (Fig. 15C, F). En una etapa subsiguiente de maduración, comienza el engrosamiento de las paredes de algunos grupos celulares, que responden positivamente a la prueba de lignina con el TBO pero aún no se observa fluorescencia (Fig. 15D, G). La etapa adulta de la epidermis se caracteriza por la presencia de grupos de células con lumen muy escaso y paredes lignificadas que dan fluorescencia, alternando con grupos reducidos de células con paredes no lignificadas (Fig. 15E, H).

En *Isoetes histrix* (Fig. 16) la ontogenia de la epidermis esporangial es similar, pero difieren las etapas juveniles del modelo de macrosporangios y microsporangios. En el caso del macrosporangio (Fig. 16A–G), la ontogenia sigue el modelo tipo *I. setacea*, mientras que las etapas juveniles del microsporangio (Fig. 16H–L) se inician con un modelo poligonal de células isodiamétricas (Fig. 16H) que pasa por etapas de modelo subsinuoso (Fig. 16I, J) previas al establecimiento del tipo adulto, en parqué (Fig. 16L). Las etapas inmaduras de la pared de macrosporangios y microsporangios en las que se presentan grupos de células con paredes primarias y células con paredes secundarias son morfológicamente muy similares (Fig. 16F, K). Las microsporas y macrosporas están maduras en la etapa ilustrada en Figura 16G y 16L; hay microsporas ya diferenciadas pero sin la ornamentación característica en la etapa ilustrada en Figura 16J, y macrosporas ya diferenciadas pero no de tamaño adulto en la etapa ilustrada en la Figura 16F. Es decir, no hay sincronía en la maduración de la ornamentación esporal ni coincidencia en las etapas iniciales de la ontogenia en los esporangios de *I. histrix*.

CONSIDERACIONES SOBRE ALGUNOS GRUPOS DE ESPECIES

El caso de *Isoetes nuttallii* (Fig. 17A–H), *I. orcuttii* (Fig. 17I–P) e *I. howellii* (Fig. 17Q–Y) suministra un interesante ejemplo de aplicación de los caracteres aquí estudiados. Se trata de especies fenotípicamente muy similares, que conviven en charcas temporales. Las especies difieren en el modelo epidérmico, las relaciones l/a celulares, la densidad y dimensiones de los estomas, las ornamentaciones cuticulares, la presencia o ausencia de cuñas, las secciones foliares, la presencia y tipo de colénquima, los tipos de células de los diafragmas, la presencia y tipos de PIP, el contorno de la lígula, la duración de la función secretora marginal, el modelo epidérmico del velo y de los esporangios. *Isoetes howellii* es muy característica y se distingue fácilmente de las otras dos especies por la extensión del velo y la pigmentación del esporangio, pero para observar estos caracteres, las plantas deben estar maduras. *Isoetes orcuttii* e *I. nuttallii* se distinguen fundamentalmente por el tamaño de las hojas y de las macrosporas (Taylor et al., 1993). Un simple corte transversal de los microfilos, no necesariamente maduros, permite reconocer las tres especies por los caracteres de su anatomía foliar.

Este conjunto de caracteres es útil en otros grupos de especies, como *Isoetes brochonii*, *I. echinospora* e *I. lacustris*. La coincidencia de algunos caracteres morfológicos se debe a la relación de parentesco existente entre ellas (Taylor & Hickey, 1992). Las plantas de *I. lacustris* son muy semejante a las de *I. brochonii*, pero un examen de ambas especies muestra que *I. lacustris* se caracteriza por las estrías cuticulares gruesas y discontinuas, las cuñas cuticulares sobrelevadas, la lígula largamente secretora y la pared esporangial con un modelo en parqué cuyas células contactan mediante paredes curvas, mientras que *I. brochonii* tiene estrías irregulares y carece de cuñas cuticulares, su lígula se esclerosa tempranamente y la pared adaxial del esporangio tiene un modelo en parqué cuyas células contactan mediante paredes angulosas, rasgo éste que comparte con *I. echinospora*.

En el grupo de *Isoetes velata* se reúnen especies con esporas muy similares (macrosporas pustuladas con bulas de diferentes tamaños y microsporas equinadas o lisas a oscuramente papilosas). *Isoetes velata* subsp. *velata* (incluyendo *I. tenuissima* Boreau) se caracteriza por la presencia de velo casi completo; *I. adspersa* se segrega por la menor extensión del velo; *I. boryana* por la ausencia de bases foliares papiráceas persistentes y por microsporas lisas a sub-papilosas; *I.*

←
células con núcleos ilustrados indican área secretora. G, O, X. Modelos epidérmicos del velo. H, P, Y. Modelo epidérmico adaxial de los esporangios, en Y, las áreas oscuras indican células epidérmicas no lignificadas, conteniendo taninos. Escala: 100 µm en A, C, I, K, Q, S; 70 µm en D, L, T; 125 µm G, H, O, P, X, Y; 150 µm en F, N, V; 2 mm en B, J, R; 1.5 mm en E, M, U.

longissima, por la longitud de sus microfilos e *I. velata* subsp. *asturicensis*, por sus macrosporas casi lisas (Maire, 1952; Prada, 1986; Jermy & Akeroyd, 1993). Los caracteres que se utilizan para diferenciar estas especies pueden ser tan variables que en la práctica resulta difícil asignar un ejemplar a un nombre. Los caracteres analizados aquí indican que todas comparten las cutículas estriadas y excluyendo a *I. boryana*, comparten los estomas actinocíticos y las PIP verrucosas. *Isoetes adspersa* podría ser considerada una buena especie, que se distingue por la cutícula uniformemente estriada, las relaciones l/a celulares 1:1, el modelo epidérmico del velo subsinuoso, con células grandes y la pared esporangial con células tánicas, veteada externamente. Estos caracteres también podrían indicar que *I. boryana* es una buena especie caracterizada por la cutícula finamente estriada en toda la pared externa, el modelo epidérmico de los microfilos con relación l/a celular 1:1, el contorno de los estomas y el modelo poligonal de la epidermis del velo. *Isoetes longissima*, *I. velata* subsp. *velata* e *I. velata* subsp. *asturicensis* coinciden en casi todos los rasgos de los microfilos, de la lígula, del velo y del esporangio. *Isoetes velata* subsp. *velata* e *I. velata* subsp. *asturicensis* difieren únicamente en la cantidad de hacecillos de colénquima, más abundantes y con células más engrosadas en la subespecie tipo. De acuerdo con lo observado aquí, la reducción del colénquima en *I. velata* subsp. *asturicensis* se relacionaría con la altura y esta subespecie podría ser considerada tan sólo como una forma de *I. velata*, pero no un taxón diferente. *Isoetes longissima* tiene verrugas pécticas más esparcidas, con la superficie rugosa y células de los diafragmas con micro-pip (Prada & Rolleri, 2005), mayor tamaño de lígula, células epidérmicas, estomas y esporas. Estos caracteres, incluyendo su mayor ploidía, justificarían su reconocimiento como un taxón diferente, probablemente con nivel subespecífico.

Discusión

En las diagnosis de especies de *Isoetes* se usaron casi siempre caracteres cuantitativos como el número de lóbulos del cormo, la longitud y anchura de las hojas, el número de microfilos de las plantas, la anchura y extensión del ala membranosa marginal foliar, la extensión del velo, los tamaños esporales, etc., o bien caracteres cualitativos de difícil generalización, como el color de las hojas, la forma de la lígula y de los esporangios, las ornamentaciones esporales, etc. Las claves basadas en este tipo de caracteres no siempre permiten determinar con seguridad las especies.

Los caracteres foliares aquí estudiados tienen un valor diagnóstico variable. La presencia de una lígula secretora de mucílago y de una endodermis en los canales intrastelares y en las cámaras aeríferas de los microfilos son comunes a todas las especies y son caracteres genéricos en *Isoetes*. Los contornos de las secciones foliares, los tipos de colénquima (en haces, lacunar o parcialmente laminar), los tipos de células de los diafragmas foliares, la presencia o ausencia de PIP, la extensión de la endodermis en las cámaras aeríferas, la persistencia de la función secretora de la lígula o el esclerosamiento temprano de este órgano, y el grado de desarrollo de un labio amiláceo, son rasgos que caracterizan grupos de especies. La presencia y tipos de ornamentaciones cuticulares, las cuñas cuticulares sobresalientes, los márgenes papilosos, los modelos y las relaciones l/a celulares de las células epidérmicas de los microfilos, los tipos o combinaciones de tipos de PIP, los modelos y las relaciones l/a celulares de las células epidérmicas del velo, el modelo epidérmico de la pared adaxial de los esporangios y la naturaleza de las paredes celulares en estas epidermis, son caracteres específicos.

Aunque individualmente o de manera aislada se hayan estudiado algunos caracteres específicos de los mencionados arriba, tal y como se han presentado aquí no han sido utilizados previamente en el género. Los caracteres que parecen tener mayor valor diagnóstico son aquéllos relacionados con la epidermis de los microfilos. En el caso de las ornamentaciones y cuñas cuticulares, cuando aparecen, se diferencian tempranamente y son visibles en plántulas y plantas adultas (Prada & Rolleri, 2003). Si la epidermis es lisa, estriada o verrucosa, y si tiene o no cuñas sobresalientes, el carácter será apreciable en microfilos juveniles y en adultos, y será un rasgo característico de la especie.

Los caracteres estomáticos no son específicos. En muchas especies las células periestomáticas se disponen de forma aproximadamente actinocítica y en otras este ordenamiento no se observa (Prada & Rolleri, 2003). Cuando aparece la disposición actinocítica, las especies que la presentan también son afines por otros caracteres morfológicos. Las dimensiones de los estomas varían con un rango similar en especies de áreas geográficas diferentes.

La mayoría de las especies estudiadas de *Isoetes* tienen algún tipo de tejido mecánico colenquimático. La organización en haces no es el único tipo de colénquima en *Isoetes* aunque hasta ahora parece ser el más común (Prada, 1979a; Prada & Rolleri, 2003). Algunas especies desarrollan los tipos aquí descritos como lacunar y parcialmente laminar, e incluso puede presentarse una combinación de dos tipos de colénquima en la misma especie. La mayor diversidad

de tipos de colénquima se ha encontrado en especies de los páramos, pero también hay especies de tierras bajas, como *I. melanopoda* e *I. piedmontana*, en las que se presenta a la vez colénquima en haces y lacunar.

Pfeiffer (1922) señaló que la presencia de colénquima estaría influida por el hábitat y que tiende a estar ausente en las especies acuáticas. Pastore (1936) consideró que su presencia es un rasgo de madurez de las plantas, no condicionado por el hábitat. Prada y Rolleri (2003) señalaron que había una disminución de los haces en algunas especies acuáticas, pero sugirieron que en ciertos taxones podría ser un rasgo específico, ya que no todos los acuáticos estudiados carecían de colénquima. El hecho de que las plantas juveniles y adultas de *Isoetes lechleri* presenten colénquima lacunar y que en *I. velata* el colénquima en haces sólo esté bien desarrollado en plantas adultas podría indicar que todo lo relacionado con el colénquima tiene variación específica y representa una fuente de caracteres diagnósticos no desechable. La formación de colénquima como tejido de sostén es típica de *Isoetes* pero su relación con el hábitat, el grado de inmersión de las hojas u otros factores está aún sin probar.

Las PIP y los diafragmas foliares también presentan caracteres diagnósticos de interés. Las lobulaciones de las células de los diafragmas varían, pero aún no se conoce este carácter en un número suficiente de especies para valorar su utilidad. Hay especies muy similares, como *Isoetes nuttallii* e *I. orcuttii*, en las que el tamaño y forma de las células de los diafragmas varían, mientras que en especies diferentes y fácilmente distinguibles, como *I. anatolica* e *I. malinverniana*, las células de los diafragmas son muy similares. Las células globosas de los diafragmas no suelen presentar PIP y las lobuladas o estrelladas generalmente las presentan. Las PIP parecen más bien difundidas en *Isoetes*, y hasta ahora, los tipos o combinaciones de tipos son específicos (Prada & Rolleri, 2005).

Los canales intrastelares fueron señalados como de posible valor sistemático por autores recientes (Hall, 1971; Prada, 1979a; Takamiya et al., 1997). Aquí se ha observado que el número de los mismos es estable en la mayoría de las especies, con excepción de *Isoetes histrix*, donde aparece un número variable entre 1 y 5, aunque es posible que, por tratarse de una especie terrestre sometida a inundación estacional, estas variaciones tengan alguna relación con el hábitat. Hall (1971) sugirió que los canales llevan agua y no aire. Esta es una interesante afirmación en relación con lo anterior, ya que el mayor número de canales intrastelares en plantas anfibias o terrestres podría relacionarse con la necesidad obvia en éstas de evitar que los tejidos vasculares se inunden periódicamente, una función a la que contribuye la presencia de endodermis en los canales (Rolleri & Prada, 2004).

Se han encontrado dos tipos morfológicos principales de lígulas, las que tienen contornos ovados y las que tienen contornos lanceolados, con ligeras variaciones en la forma general y el tamaño en plantas de una misma especie o aún en microfilos de una misma planta. La lígula es un órgano secretor de mucílago, pero la extensión del área marginal secretora y la duración de esta función parecen ser específicas. No se ha podido establecer una relación entre el hábitat y estos caracteres morfológicos y fisiológicos de las lígulas, ya que el mismo tipo se presenta en especies de diferentes hábitats (lígulas de *Isoetes boryana*, *I. durieui*, *I. histrix*, *I. howellii*, *I. lacustris*, *I. setacea*, *I. velata* susbp. *velata*, *I. velata* susbp. *asturicensis*). Especies que conviven pueden presentar lígulas distintas, como es el caso de *I. nuttallii* e *I. orcuttii* en relación con *I. howellii*. Se destacan por su temprana lignificación y el cese de la función secretora las lígulas de especies totalmente distintas como son *I. andina*, *I. brochonii* e *I. killipii*. El estudio de un número más amplio de taxones podría indicar eventuales líneas de especialización de este órgano en el conjunto del género, pero el grado de accesibilidad del carácter, el hecho de que en muchos casos se trata de una estructura efímera que se pudre con facilidad o que se destruye si se manipula material seco sin una restauración adecuada, hace que la evaluación de este rasgo sea algo más difícil que en el caso de otros caracteres foliares.

En la mayoría de las especies estudiadas aquí, el labio varía más que la lígula en los microfilos de la misma especie. Tanto el velo como el labio son estructuras que contienen almidón y podrían tener función similar. Goswami (1976) señala que el labio tiende a reducirse en las especies que presentan velo. Según ese autor, en el curso de la ontogenia, el labio o la lígula podrían ser estructuras caducas y el labio sería más importante que la lígula en especies sin velo. La relación entre el desarrollo del labio y el del velo no es tan clara: *Isoetes anatolica* carece de velo y tiene un labio generalmente bien desarrrollado; *I. setacea*, sin velo, e *I. histrix*, con velo, tienen labios similares, cortos y reducidos, e *I. melanopoda*, con velo parcial, tiene un labio más desarrollado que el de *I. histrix*, con velo completo y similar al de *I. anatolica*, que carece de velo.

La epidermis del velo varía específicamente. En las especies estudiadas predominan los modelos poligonales, pero varían las relaciones l/a y los tamaños celulares. Es posible que los tamaños, como en otras epidermis (Barrington et al., 1986), tengan relación con la ploidía interna, pero la variación observada es

específica. En combinación con otros rasgos foliares permite caracterizar las especies.

El modelo epidérmico del esporangio difiere del modelo de los microfilos y del modelo del velo y tanto el patrón celular adaxial como el color externo del esporangio son caracteres de variación interesante. En las especies estudiadas y en otros trabajos en los que se ilustra la epidermis adaxial del esporangio, el modelo más frecuente es el que aquí se ha llamado en parqué, formado por células con pared primaria y sin taninos. Este es también el modelo básico de los esporangios en los que se combinan grupos de células con pared primaria y otros con paredes lignificadas o con taninos. En todos los modelos restantes (poligonales, subsinuosos o sinuosos) las células tienen paredes primarias y no contienen taninos.

En las especies estudiadas el modelo epidérmico de microsporangios y macrosporangios adultos coincide. Las etapas juveniles de esos modelos no necesariamente coinciden en uno u otro tipo de esporangio. No es raro que las plantas de *Isoetes* tengan macrosporangios maduros cuando los microsporangios están aún en etapas juveniles del desarrollo de su pared, algo que es necesario tener en cuenta al utilizar el rasgo para caracterizar a una determinada especie. Sólo los esporangios con pared adulta tienen esporas con su ornamentación completamente desarrollada, lo que podría explicar los casos de algunas de las especies cuyas microsporas se han descrito como de ornamentación variable cuando en realidad podría tratarse de diferentes etapas de maduración de la pared del esporangio y de las esporas que contiene.

Varios autores utilizaron el color externo visible de la pared esporangial como carácter diagnóstico y en todos los casos los tipos de pared esporangial que mencionan podrían clasificarse en los que se han observado aquí. Maire (1952) lo utilizó para distinguir entre taxones del grupo de *Isoetes velata*, y observó paredes veteadas en *I. adspersa*, en las que el color externo se debe a taninos. Hall (1971) ilustró diferencias en la epidermis esporangial de *I. abyssinica* Chiovenda, *I. nigritiana* A. Braun e *I. tenuifolia* A. C. Jermy. Ilustró un modelo similar al de *I. adspersa*, en *I. abyssinica* y un modelo en parqué con células con paredes primarias alternando con otras con paredes engrosadas, en *I. tenuifolia*. El esporangio de *I. nigritiana* no está ilustrado pero lo describe como similar al de *I. tenuifolia*, con paredes celulares menos engrosadas. Hall (1971) sugiere que esas paredes engrosadas no estarían lignificadas, por su reacción negativa ante floroglucina clorhídrica, pero esta prueba no es adecuada para lignina de pteridófitos (Johansen, 1940).

Kott y Britton (1985) citaron esporangios con paredes coloreadas y no coloreadas en especies norteamericanas de *Isoetes*. La ilustración que presentan de *I. riparia* Engelm. sugiere un modelo en parqué del tipo formado por células con paredes primarias y células con paredes lignificadas, pero esos autores no analizaron el origen del color e indicaron que la coloración externa estaba correlacionada con otros rasgos, como los esporales. Hickey (1986) incluyó la pigmentación esporangial en un análisis cladístico y consideró que el color sería un carácter primitivo. En ese trabajo no se distingue tampoco el origen del color, aunque se sugiere que los caracteres con los que se asocia (filopodios, color de las escamas, etc.) estarían intimamente relacionados.

En las especies estudiadas aquí, los esporangios pueden ser externamente hialinos, veteados de castaño o uniformemente castaños. El origen del color es variable. Las paredes externamente veteadas siempre se han visto en el caso de modelos que presentan células taníferas, la asociación entre estas células y esporangios de pared veteada podría ser el caso más frecuente. Las paredes externamente sin color se encuentran tanto en modelos con paredes primarias no lignificadas como en modelos con paredes engrosadas y lignificadas. Por ejemplo, los esporangios de *Isoetes andina* e *I. piedmontana* son externamente coloreados y tienen células lignificadas, mientras que en *I. histrix* e *I. setacea*, también hay células lignificadas pero no color externo. En la bibliografía sobre *Isoetes* se le ha conferido valor diagnóstico al color de la pared del esporangio. Aquí se amplían las posibilidades de utilización sistemática del carácter, agregando el modelo epidérmico, el origen del color y la naturaleza de sus paredes.

Hay toda una etapa del estudio botánico que parece haberse omitido en *Isoetes*. Superado el tratamiento tipológico y el análisis de caracteres morfológicos externos, el género ha sido enfocado desde un modelo llamado biológico, que no dependería de límites morfológicos sino reproductivos (Hickey et al., 1989). Ese enfoque ha pasado por alto la consideración de algunos caracteres morfológicos más estables que los externos, no dependientes de variables como edad de las plantas, fenología y condiciones de crecimiento. El número de especies de *Isoetes* estudiadas en detalle es bajo en relación con el número de especies descritas para el género. Un mejor conocimiento de los caracteres de cada especie permitiría establecer un ordenamiento más natural y sería más fácil ver las eventuales líneas morfológicas o combinaciones de rasgos en el género como un todo y analizar el significado de cada una de ellas. Las propuestas de división infragenérica y de interpretación de la filogenia del género basada en los caracteres morfológicos externos tradicionales (Hickey, 1986;

Taylor & Hickey, 1992) o esporales (Pfeiffer, 1922) no se han visto avaladas por los resultados de otro análisis filogenético basado en el estudio de las secuencias del ADN plastidial (Ryding & Wikström, 2002).

Con frecuencia se afirma que *Isoetes* es un género con escasos caracteres de valor diagnóstico. Sin embargo, de acuerdo con nuestras observaciones, las especies presentan grupos de caracteres independientes de la ornamentación de sus esporas, que resultan útiles y que deberían ser incluidos en las descripciones. Las plantas de *Isoetes* pueden ser externamente muy semejantes, pero caracteres como los que se han estudiado aquí, cuya apreciación no es difícil ni engorrosa, permitirían determinarlas con mayor seguridad y se dispondría de un mayor número de rasgos estables de aplicación en estudios cladísticos o de relaciones filogenéticas en el género.

El conjunto de caracteres analizados tiene un valor diagnóstico interesante: complementa los esporales frecuentemente utilizados como básicos en el género; puede reemplazar a los esporales en ciertos casos; permite el análisis de muchas colecciones en las que las esporas no están presentes; permite distinguir entre especies diferentes pero fenotípicamente similares; permite determinar ciertas especies en distintas etapas fenológicas y reconocer esas etapas. Son caracteres que están siempre disponibles y se requieren pequeñas cantidades de material (de herbario o fresco) para su estudio.

Literatura Citada

Baker, J. G. 1880. A synopsis of the species of *Isoetes*. Bull. Soc. Bot. France 27: 69–73.

Bar, A. D. & L. J. Musselman. 1997. New hybrids in the genus *Isoetes* (quillworts) in the southeastern United States. A. S. B. Bull. 44(2): 119–120.

Barrington, D. S., C. A. Paris & T. A. Ranker. 1986. Systematic inferences from spore and stomate size in the ferns. Amer. Fern J. 76: 149–159.

Bory de Saint-Vincent, J. B. G. M. 1844. Sur les *Isoetes* et les espèces nouvelles de cette famille découvertes en Algérie. Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. 18: 1163–1168.

Braun, A. 1862. Anhang über einige auslandische Arten der Gattung *Isoetes*. Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg 3: 226–228.

Britton, D. M. & D. F. Brunton. 1995. *Isoetes* × *marensis*, a new interspecific hybrid from western Canada. Canad. J. Bot. 73: 1345–1353.

Brunton, D. F. & D. M. Britton. 1997. Appalachian quillwort (*Isoetes appalachiana*, sp. nov.; Isoetaceae), a new pteridophyte from the eastern United States. Rhodora 99: 261–275.

———, ——— & T. F. Wieboldt. 1996. Taxonomy, identity, and status of *Isoetes virginica* (Isoetaceae). Castanea 61(2): 145–160.

Cesati, V. & C. De Notaris. 1858. Index Sem. Hort. Genuensis 1858. Genova.

Engelmann, G. 1882. The genus *Isoetes* in North America. Trans. Acad. Sci. St. Louis 4: 358–390.

Fernández Casas, J. 1977. Recuentos cromosómicos en plantas vasculares españolas. Saussurea 8: 33–56.

Giovannini, A. F., F. Garbari & A. Giordani. 2001. The chromosome number of *Isoetes durieui* Bory (Lycopodiophyta-Isoetaceae). Webbia 56: 219–221.

Goswami, H. K. 1976. A revision of ligule and labium in *Isoetes*. Acta Soc. Bot. Poloniae 45: 69–76.

Gurr, L. 1966. The Rational Use of Dyes in Biology and General Staining Methods. Williams and Wilkins, Baltimore.

Hall, J. B. 1971. Observations on *Isoetes* in Ghana. Bot. J. Linn. Soc. 64: 117–139.

Hickey, R. J. 1984. Chromosome numbers of neotropical *Isoetes*. Amer. Fern J. 74: 9–13.

———. 1986. The early evolutionary and morphological diversity of *Isoetes*, with descriptions of two new neotropical species. Syst. Bot. 11: 309–321.

———, W. C. Taylor & N. T. Luebke. 1989. The species concept in Pteridophyta with special reference to *Isoetes*. Amer. Fern J. 79: 78–89.

Holmgren, P. K., N. H. Holmgren & L. C. Barnett. 1990. Index Herbariorum, Part I: Herbaria of the World, 8th ed. New York Botanical Garden Press, New York.

Jermy, A. C. 1990. Isoetaceae. Pp. 26–31 *in* K. U. Kramer & P. S. Green (editores), The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. I. Springer-Verlag, Berlin.

——— & J. R. Akeroyd. 1993. *Isoetes* L. *In* T. G. Tutin, N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmonson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters & D. A. Webb (editores), Flora Europaea, Vol. 1: Psilotaceae to Platanaceae, 2nd. ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Company, New York.

Kay, Q. O. N. 1974. Diploid *Isoetes* echinospora in Britain. Fern Gaz. 11(1): 56–57.

Kott, L. S. & D. M. Britton. 1980. Chromosome numbers for *Isoetes* in Northeastern North America. Canad. J. Bot. 58: 980–984.

——— & ———. 1985. Role of morphological characteristics of leaves and the sporangial region in the taxonomy of *Isoetes* in northeastern North America. Amer. Fern J. 75: 44–55.

Maire, R. 1952. Flore de l'Afrique du Nord. Encycl. Biol. 33: 87–94.

Manton, I. 1950. Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Matthews, J. F. & W. H. Murdy. 1969. A study of *Isoetes* common to the granite outcrops of the southeastern Piedmont, United States. Bot. Gaz. 130(1): 53–61.

Motelay, L. & H. Vendryès. 1882. Monographie des Isoëteae. Actes Soc. Linn. Bordeaux 4ème sér., 6: 2–404.

Musselman, L. J. & J. P. Roux. 2002. *Isoetes toximontana* (Isoetaceae), a new quillwort with green megaspores from the Northern Cape of South Africa. Novon 12: 504–507.

Pastore, A. L. 1936. Las Isoetáceas argentinas. Revista Mus. La Plata, Secc. Bot. 1: 1–30.

Pfeiffer, N. E. 1922. Monograph of the Isoetaceae. Ann. Missouri Bot. Gard. 9: 79–233.

Prada, C. 1979a. Estudio de la anatomía foliar de las especies españolas del género *Isoetes*. Lagascalia 9: 107–113.

———. 1979b. Estudios palinológicos y cromosómicos en las especies españolas del género *Isoetes* L. (Isoetaceae). Palinologia 1: 211–225.

———. 1983. El género *Isoetes* en la Península Ibérica. Acta Bot. Malac. 8: 73–100.

——. 1986. *Isoetes* L. *In* S. Castroviejo, M. Laínz, G. López González, P. Monteserrat, F. Muñoz Garmendia, J. Paiva & L. Villar (editores), Flora Iberica, Vol. 1, Lycopodiaceae-Papaveraceae. C. S. I. C., Madrid.

——— & C. H. Rolleri. 2003. Caracteres diagnósticos foliares en táxones ibéricos de *Isoetes* L. (Isoetaceae, Pteridophyta). Anales Jard. Bot. Madrid 60(2): 371–386.

—— & ———. 2005. A new species of *Isoetes* L. (Isoetaceae) from Turkey with a study of microphyll intercellular pectic protuberances and their potential taxonomic value. Bot. J. Linn. Soc. 147(2): 213–228.

Prelli, R. 2001. Les Fougères et Plantes Alliées de France et d'Europe Occidentale. Belin, Paris.

Rolleri, C. H. & C. Prada. 2004. Endodermis foliares en *Isoetes* L. (Isoetaceae, Pteridophyta). Acta Bot. Malac. 29: 191–201.

Romeo, D., A. Troia, C. Burgarella & E. Bellini. 2000. Casparian strips in the leaf intrastelar canals of *Isoetes durieui* Bory, a Mediterranean terrestrial species. Ann. Bot. (Oxford) 86: 1051–1054.

Ruzin, S. E. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford Univ. Press, London.

Rychlewski, J. & A. Jankun. 1972. Chromosome numbers of some Polish Pteridophytes. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 15(1): 51–60.

Rydin, C. & N. Wikström. 2002. Phylogeny of *Isoetes* (Lycopsida): Resolving basal relationships using *rbcL* sequences. Taxon 51: 83–89.

Schneller, J. J. 1982. Cytological investigations on *Isoetes malinverniana*. Webbia 35(2): 307–309.

Scott, A. H. & G. T. Hill. 1900. The structure of *Isoetes histrix*. Ann. Bot. (Oxford) 14: 413–454.

Stokey, A. 1909. The anatomy of *Isoetes*. Bot. Gaz. 47: 311–335.

Takamiya, M., M. Watanabe & K. Ono. 1997. Biosystematic studies on the genus *Isoetes* (Isoetaceae) in Japan. IV. Morphology and anatomy of sporophytes, phytogeography and taxonomy. Acta Phytotax. Geobot. 48: 89–122.

Taylor, W. C. & R. J. Hickey. 1992. Habitat, evolution, and speciation in *Isoetes*. Ann. Missouri Bot. Gard. 79: 613–622.

——— & N. T. Luebke. 1988. *Isoetes* × *hickeyi*: A naturally occurring hybrid between *I. echinospora* and *I. macrospora*. Amer. Fern J. 78: 6–13.

———, ———, D. M. Britton, R. J. Hickey, D. F. Brunton. 1993. Isoetaceae. Pp. 64–75 *in* Flora of North America Editorial Committee. 1993. Flora of North America: North of Mexico, Vol. 2. Pteridophytes and Gymnosperms. Oxford Univ. Press, New York.

Troia, A. 2001. The genus *Isoetes* L. (Lycophyta, Isoetaceae): Synthesis of karyological data. Webbia 56(1): 201–218.

——, D. Romeo, C. Burgarella & E. Bellini. 1999. Comparative leaf anatomy of *Isoetes histrix* Bory and *I. durieui* Bory (Isoetaceae-Lycopodiophyta). Abstracts of the 94th Congress of Società Botanica Italiana, Ferrara, the Italian Society of Botany: 51.

West, C. & H. Takeda. 1915. On *Isoetes japonica* A. Braun. Trans. Linn. Soc. London, Bot. 8: 333–376.

Winstead, J. E. & L. J. Musselman. 1994. Ecophenic patterns of *Isoetes engelmannii* in a roadside and pond habitat of south central Kentucky [abstract]. A. S. B. Bull. 41: 123.

APÉNDICE 1. ESPECÍMENES REPRESENTATIVOS DE LAS ESPECIES DE *ISOETES* ESTUDIADAS ANATOMICAMENTE EN ESTE TRABAJO.

Isoetes adspersa A. Braun. ARGELIA. **Orán**: Mare du Djebel Santo, 11 Mayo 1883, *Debeaual s.n.* (MA); Rou Sfer, Foret de M'Sila, 26 Abr. 1891, *Doumergue s.n.* (MA).

Isoetes anatolica Prada & Rolleri, Bot. J. Linn. Soc. 147 (2): 215. 2005. TURQUÍA. **Bolu**: S de Abant Golu, *Aedo et al. 6181* (MA), *6185* (MA).

Isoetes andina Spruce ex Hook. f. COLOMBIA. **Cundinamarca**: Laguna de Chisacá, *Acosta-Arteaga 250* (MA); Macizo de Sumapaz, Andabobos, *Cuatrecasas 27038* (MA). ECUADOR. **Chimborazo**: 10 km NE of Alao at Cuspipacha, 6 Mayo 1982, *Øllgaard et al. s.n.* (MA).

Isoetes boliviensis U. Weber. BOLIVIA. **La Paz**: Entre Escoma y Hualcapayo, *Ceballos et al. Bo-672* (MA).

Isoetes boryana Durieu. FRANCIA. **Gironde**: Etang de Cazaux, 7 Jun. 1897, *Giraudias s.n.* (MA); Sep. 1902, *Casares Gil s.n.* (MA).

Isoetes brochonii Motelay, Extr. Actes Soc. Linn. Bordeaux, 5 série, 45: 45. 1892. ESPAÑA. **Lérida**: Estany de la Pera, *Carrasco 19902 & Martín Blanco* (MACB). FRANCIA. **Ariège**: vallée d'Orlu, près Aix-les-Thermes, lac de Naguilles, *Neyraut et al. s.n.* (MA). **Pyrénées Orientales**: Les Bouillouses, Lac du Vive, 20 Ago. 1989, *Prada s.n.* (MACB); Etang des Dougnes, Sep. 1994, *Herrero s.n.* (MACB).

Isoetes durieui Bory de Saint-Vincent, Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. 18: 1166. 1844. ESPAÑA. **Cádiz**: Ubrique, Collado del Cuervo, *Silvestre TF 75* (SEV); Entre Tarifa y Algeciras, *Luque et al. 2176/78* (SEV). **Madrid**: entre Hoyo de Manzanares y Colmenar Viejo, Jun. 1988, *Prada s.n.* (MACB); Torrelodones, Mayo 2001, *Prada s.n.* (MACB).

Isoetes echinospora Durieu. ANDORRA. Estanys de Pessons, 9 Ago. 1977, *Prada s.n.* (MACB). ESPAÑA. **Soria**: Laguna Larga de Urbión, 23 Ago. 1972, *Montserrat s.n.* (JACA); Laguna Negra de Urbión, 21 Sep. 1978, *Rivas Martínez s.n.* (MACB). FRANCIA. **Pyrénées Orientales**: Les Bouillouses, Lac du Vive, 20 Ago. 1989, *Prada s.n.* (MACB); Lac Noir, Sep. 1994, *Herrero s.n.* (MACB); Lac de Pradeillles, 8 Sep. 1988, *Prada s.n.* (MACB).

Isoetes engelmanii A. Braun. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **Massachusetts**: Hampshire Co., Haydenville, Northampton Reservoir, *Ahles 77676* (MA).

Isoetes histrix Bory de Saint-Vincent, Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. 18: 1167. 1844. ESPAÑA. **Cáceres**: Pasado Plasencia, 9 Abr. 1978, *Prada s.n.* (MACB); Abadía, hacia el Embalse de Gabriel y Galán, 30 Mayo 1985, *Ramos et al. s.n.* (MACB). **Cádiz**: entre Tarifa y Algeciras, *Luque et al. 2176/78* (SEV); Sierra del Aljibe, Puerto de Gáliz, *Silvestre TF 61* (SEV). **Ciudad Real**: Alcoba, Parque Nac. de Cabañeros, 1 Jun. 2000, *Bernal & Hernández s.n.* (MACB). **Coruña**: Torre de Hércules, 10 Oct. 1976, *Prada s.n.* (MACB). **Huelva**: Laguna de la Dehesilla, 22 Feb. 2002, *Fuertes s.n.* (MACB); Coto de Doñana, Abr. 1979, *Cubas s.n.* (MACB). **Madrid**: Torrelodones, Mayo 2001, *Prada s.n.* (MACB). **Pontevedra**: Cabo Silleiro, 16 Feb. 1989, *Prada s.n.* (MACB). FRANCIA. **Finisterre**: Bigouden, 23 Abr. 2002, *Citoleux s.n.* (MACB). PORTUGAL. **Algarve**: alrededores de Faro, Pinhal do Ludo, 25 Abr. 1951, *Sobrinho & Mendes s.n.* (COI). **Beira Litoral**: Leiria versus Marinha Grande, 8 Jun. 1956, *Pinto da Silva et al. s.n.* (LISE). MARRUECOS. **Rabat**: Temara, 10 km S de Rabat, 20 Feb. 1978, *Damblon 78/2* (MA).

Isoetes howellii Engelmann, Trans. Acad. Sci. St. Louis 4: 385. 1882. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **California**: Sacramento Co., Howard Ranch, 25 Abr. 2001, *Molina s.n.* (MACB).

Isoetes killipii C. V. Morton. COLOMBIA. **Boyacá-Santander**: Charalá, Páramo de la Rusia, *Fernández Alonso et al. 6104* (MA).

Isoetes lacustris L. ANDORRA. Estanys Furcat, 13 Ago. 1949, *Losa & Montserrat s.n.* (MAF). BULGARIA. Montes Pirin, Lago Muratovo, *Burgaz et al. s.n.* (MACB). ESPAÑA. **Lérida**: Estanys d'Unarre (Pallars Sobirà), 27 Jun. 1985, *Masalles & Ninot s.n.* (MACB); Est. de la Pera, 19 Ago. 1989, *Prada s.n.* (MACB); Lac d'Anglade, Vieille Aure, 12 Ago. 1971, *Montserrat s.n.* (JACA); Est. hacia el Est. Negre, 6 Ago. 1958, *Montserrat s.n.* (JACA); Est. Cavallers, pr. Caldes de Bohí, 22 Jul. 1944, *sine coll.* (MA). FRANCIA. **Ariège**: Aix-les-Thermes, lac de Naguilles, *sine coll., s.n.* (MA). **Pyrénées Orientales**: Les Bouillouses, Lac Long, 7 Ago. 1977, *Pardo & Prada s.n.* (MACB); Lac d'Oredon, *Dussaussois FR-65* (MACB). ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **Wisconsin**: Oneida Co., Pelican Lake, Mayo 1989, *Taylor & Prada s.n.* (MACB).

Isoetes lechleri Mett. BOLIVIA. **La Paz**: Omasuyos, entre Achacachi y Sorata, cerca de Humanata, *Ceballos et al. BO-580* (MA); Omasuyos, pr. Achacachi, *Fernández Casas 6619* (MA).

Isoetes longissima Bory de Saint-Vincent, Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. 18: 1165. 1844. ESPAÑA. **Coruña**: Teijeiro, Río Mandeo, 10 Oct. 1976, *Prada s.n.* (MACB). **Lugo:** Vilalva, Codesido, Río San Martiño, 5 Sep. 1992, *Soñora s.n.* (MA).

Isoetes malinverniana Cesati & De Notaris, Ind. Sem. Horti Genuensis 1858: 36. 1858. ITALIA. **Alejandría**: pr. Isarno et Vignale, 1910, *Gola s.n.* (MA). **Vercelli**: Oldenico, *Raynal 20885* (MA).

Isoetes melanopoda J. Gay & Durieu. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **Georgia**: Butts Co. pr. Jackson, 10 Mayo 1989, *Luebke & Prada s.n.* (MACB).

Isoetes novo-granadensis H. P. Fuchs. COLOMBIA. **Cundinamarca**: de Villapinzón a Umbita, *Fernández et al. 15560* (MA).

Isoetes nuttallii A. Braun ex Engelm. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **California**: Sacramento Co., Howard Ranch, 25 Abr. 2001, *Molina s.n.* (MACB).

Isoetes orcuttii A. A. Eaton. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **California**: Sacramento Co., Howard Ranch, 25 Abr. 2001, *Molina s.n.* (MACB).

Isoetes piedmontana (N. Pfeiffer) C. F. Reed. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **Georgia**: Lithonia, Roch Chapel Road, 10 Mayo 1989, *Luebke & Prada s.n.* (MACB).

Isoetes setacea Lam. ESPAÑA. **Cáceres**: pr. Mérida, 7 Abr. 2004, *Prada & Rolleri s.n.* (MACB); Río Ayuela, *Cubas & Prada s.n.* (MA). **Huelva**: Laguna de la Dehesilla, 22 Feb. 2002, *Fuertes s.n.* (MACB). **Madrid**: Hoyo de Manzanares, 29 Ago. 1988, *Prada s.n.* (MACB).

Isoetes storkii T. C. Palmer. COSTA RICA. **San José**: Dota Copey, Cerro Vueltas, *Castroviejo 15143SC & Sánchez* (MA).

Isoetes velata subsp. *velata* A. Braun. CÓRCEGA. **Suartone**, Tre Padule, 12 Jun. 1981, *Lambinon et al. s.n.* (MA). ESPAÑA. **Ávila**: Sierra de Gredos, Laguna Grande, *Fernández Casas 823 & García Guardia* (MA). **Cáceres**: Arroyo del Mejoral, 10 Jun. 1976, *Prada s.n.* (MACB). **Ciudad Real**: Valle de Alcudia, 22 Jun. 1983, *Prada s.n.* (MACB). **Huelva**: Coto de Doñana, Oct. 1976, *Castroviejo s.n.* (MACB). **Madrid**: Gargantilla del Lozoya, *Prada s.n.* (MACB). FRANCIA. **Indre**: Chateau Roux, Etang du Sault, 18 Jul. 1959, *Berger s.n.* (MA). **Var**: N de Fréjus, Bois de Palayson, *De Retz 65107* (MA). **Vienne**: St. Léomer, *Violleau s.n.* (MA). ARGELIA. Pr. Alger, Marais de la Rassanta, *Malato Beliz 631* (MA). MARRUECOS. Bab Taza, 26 Jun. 1930, *Font Quer s.n.* (MA). **Rabat**: Vallée du Regreg, pr. Souk-el-Arba-des-Lehoul, *Lhenuy & Sauvage 14402* (MA).

Isoetes velata subsp. *asturicensis* (Laínz) Rivas Mart. & Prada, Lazaroa 2: 327. ESPAÑA. **Asturias**: Leitariegos, laguna de Arvás, 30 Jul. 1976, *Pardo & Prada s.n.* (MACB); Turbera de Reconcos, próximo Gillón, Cangas del Narcea, *Aedo et al. CA3332b* (MA); Tchagueño d'Abaxo, próximo Cerredo, Degaña, *Aedo et al. CA3345* (MA). **Salamanca**: Sierra de Béjar, El Trampal, *Nieto 2746GN et al.* (MA).